

THESIS

MUNICH

1967

ZUR KLINISCHEN BEDEUTUNG DER BESTIMMUNG  
DER SERUMPROTEINBINDUNG VON SCHILDDRÜSEN-  
HORMONEN

LANE MEDICAL LIBRARY  
STANFORD UNIVERSITY  
300 PASTEUR DRIVE  
PALO ALTO, CALIF. 94304

Klaus / H o r n





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA40153305\\_0022](https://archive.org/details/IA40153305_0022)



AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Direktor: Professor Dr. Dr. Gustav BODECHTEL

---

ZUR KLINISCHEN BEDEUTUNG DER BESTIMMUNG DER SERUM-  
PROTEINBINDUNG VON SCHILDDRÜSENHORMONEN+

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und  
einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Klaus H o r n  
aus Erlangen

München 1967

+ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft

---

LEIDIG-DRUCK, 8000 München 25, Schöttlstraße 9, Tel. 77 26 33

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

|                      |                                |
|----------------------|--------------------------------|
| Berichterstatter:    | Professor Dr. K. Schwarz       |
| Mitberichterstatter: | Professor Dr. Dr. G. Bodechtel |
| Dekan:               | Professor Dr. M. Kiese         |

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juli 1967

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                             | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------|
| LISTE DER ABKÜRZUNGEN                                                       |       |
| I. EINLEITUNG                                                               | 7     |
| II. METHODE der Dextrangelfiltration                                        | 11    |
| 1. Theorie                                                                  | 11    |
| 2. Präparation der Dextrangelsäule                                          | 12    |
| 3. Inkubationsgemisch von Trijodthyronin- <sup>125</sup> Jod und Serum      | 12    |
| 4. Auftragen der Proben                                                     | 13    |
| 5. Fraktionssammeln                                                         | 13    |
| a) Chromatopart-Technik                                                     | 13    |
| b) BATCH-Technik                                                            | 13    |
| 6. Serumnachwaschen                                                         | 14    |
| 7. Zähltechnik                                                              | 15    |
| 8. Berechnung                                                               | 15    |
| a) Verwendung des Fraktionssammlers                                         | 15    |
| b) Anwendung der BATCH-Technik                                              | 16    |
| 9. Statistik                                                                | 17    |
| 10. Verdrängungsversuche                                                    | 20    |
| a) mit L-Trijodthyronin                                                     | 20    |
| b) mit Thyroxin                                                             | 20    |
| c) Herstellung der "kalten" T <sub>3</sub> - und T <sub>4</sub> -Lösungen   | 21    |
| III. ERGEBNISSE der Verdrängung mit Thyroxin                                | 22    |
| IV. CHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON TRIJOD-<br>THYRONIN, THYROXIN UND JODID | 24    |
| 1. METHODE der Dünnschichtchromatographie                                   | 26    |
| a) Beschichtung der Platten                                                 | 26    |
| b) Auftragen der zu trennenden Substanzen                                   | 27    |
| c) Entwicklung der Platten                                                  | 27    |
| d) Nachweis der Substanzen (38, 39)                                         | 28    |
| aa) Cer (IV)-Sulfatlösung                                                   | 28    |
| bb) Arsenitlösung                                                           | 28    |

|                                                                              | Seite |
|------------------------------------------------------------------------------|-------|
| e) Trennung der Anteile des Trijodthyronin- <sup>125</sup>                   |       |
| Jods                                                                         | 29    |
| f) Berechnung                                                                | 29    |
| g) Laufmittel                                                                | 30    |
| h) Fehlerquellen                                                             | 31    |
| aa) Menge der aufgetragenen Substanz                                         | 31    |
| bb) Laufgeschwindigkeit                                                      | 31    |
| cc) Kammersättigung                                                          | 32    |
| i) hRf-Werte von T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub> und KJ                      | 32    |
| k) Trennung von T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub> und KJ                       | 37    |
| l) Nachweisgrenzen der einzelnen Substanzen                                  | 37    |
| m) Reinheit der Substanzen                                                   | 38    |
| 1. L-Trijodthyronin- <sup>127</sup> Jod                                      | 38    |
| 2. L-Trijodthyronin- <sup>125</sup> Jod                                      | 38    |
| 2. METHODE der Papierchromatographie                                         | 40    |
| a) Stabile Phase                                                             | 40    |
| b) Aufgetragene Proben                                                       | 41    |
| c) Entwicklung des Chromatogramms                                            | 41    |
| d) Nachweis der Substanzen . . .                                             | 41    |
| e) hRf-Werte von Trijodthyronin, Thyroxin<br>und Jodid                       | 41    |
| f) Trennung von Trijodthyronin, Thyroxin<br>und Jodid                        | 42    |
| g) Reinheit der Substanzen                                                   | 43    |
| 1. L-Trijodthyronin- <sup>127</sup> Jod                                      | 43    |
| 2. L-Trijodthyronin- <sup>125</sup> Jod                                      | 43    |
| V. DEXTRANGELFILTRATION MITTELS DÜNN-<br>SCHICHTCHROMATOGRAPHIE              | 47    |
| VI. DEXTRANGELFILTRATION MIT SEPHADEX G <sub>10</sub> -                      | 51    |
| VII. BESTIMMUNG DES PROTEINGEBUNDENEN JODS<br>IM SERUM (PB <sup>127</sup> I) | 53    |

|                                                                                         | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| VIII. KLINISCHE ANWENDUNG DER DEXTRANGEL-FILTRATION                                     | 54    |
| 1. Untersuchungen über den Schilddrüsenfunktionszustand unter Ovulationshemmer-Therapie | 54    |
| 2. Schilddrüsenfunktion bei Adipositas                                                  | 59    |
| 3. Histologische Myelotomiebefunde bei Schilddrüsen-erkrankungen                        | 63    |
| 4. Veränderungen des EEGs bei Hyperthyreose                                             | 67    |
| IX. DISKUSSION                                                                          | 72    |
| X. ZUSAMMENFASSUNG                                                                      | 76    |
| XI. LITERATURVERZEICHNIS                                                                | 78    |

# LISTE DER ABKÜRZUNGEN

|                    |                                                          |
|--------------------|----------------------------------------------------------|
| $T_3$ , $T_3$ -127 | L-Trijodthyronin- <sup>127</sup> Jod (stabiles Nuklid)   |
| $T_3$ -125         | L-Trijodthyronin- <sup>125</sup> Jod (instabiles Nuklid) |
| $T_3$ -131         | L-Trijodthyronin- <sup>131</sup> Jod (instabiles Nuklid) |
| $T_4$ , $T_4$ -127 | Thyroxin (stabiles Nuklid)                               |
| PBI-127            | Protein Bound <sup>127</sup> Iodine                      |
| mCi, $\mu$ Ci      | Milli-Curie, Mikro-Curie                                 |
| $\mu$ g            | Mikrogramm                                               |
| M                  | molar                                                    |
| N                  | normal                                                   |
| IPM                | Impulse pro Minute                                       |
| DPM                | Desintegrationen pro Minute                              |
| $\bar{x}$          | Mittelwert                                               |
| $\Sigma$           | Summe                                                    |
| $\sigma$           | Standardabweichung (Sigma)                               |
| p                  | Signifikanzwahrscheinlichkeit                            |
| Rf-Wert            | Retension Factor                                         |
| hRf                | Rf-Wert mal hundert                                      |
| V                  | Volumen                                                  |

## I. EINLEITUNG

Die Schilddrüsenfunktionsdiagnostik erfuhr durch die Einführung von Radioisotopen in die klinische Medizin wesentliche Fortschritte. Radiojodspeicherungsteste gehören heute zur Routinediagnostik der Schilddrüsenerkrankungen. Radioaktive Isotope des Jods haben heute für die Schilddrüsendiagnostik auch ohne Verabreichung an Patienten ihre Bedeutung. Ein Radionuclidtest mit möglichst hoher diagnostischer Treffsicherheit, bei dem *in vitro* die radioaktive Verbindung dem Blut, Plasma oder Serum des Patienten erst außerhalb des Körpers zugegeben wird, wäre von besonderer Bedeutung z. B. für die Kindeiklinik bzw. wenn Bestimmungen wiederholt durchgeführt werden müssen.

Eine erste solche *In-vitro*-Methode für die Bestimmung der Schilddrüsenfunktion durch Messung der Aufnahme von  $^{131}\text{I}$  Jod markiertem Trijodthyronin durch Erythrocyten (T-3-RBC Uptake Method) wurde 1957 von HAMOLSKY und Mitarbeitern (1, 2) beschrieben. Diese Methode hat sich als diagnostisch brauchbar erwiesen, zeigte aber eine Vielzahl von methodischen Fehlermöglichkeiten. Diese Autoren zeigten, daß sich bei Inkubation von hyperthyreotem Plasma mit euthyreoten Erythrocyten eine hohe  $\text{T}_3$ -Aufnahme, bei Mischung von euthyreotem Plasma mit hyperthyreoten Erythrocyten eine normale  $\text{T}_3$ -Aufnahme ergibt. Die verschieden hohe Aufnahme von  $\text{T}_3$  durch die Erythrocyten bei Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen ließ natürlich eine verschiedene Plasmaproteinbindung der Schilddrüsenhormone annehmen - die Erythrocyten dienen offenbar lediglich als sekundäre Bindungsträger neben den Serumweißkörpern und haben selbst auf das Ausmaß der Bindung keinen Einfluß. Es mußte also nach einer direkten Bestimmung der Proteinbindung des Trijodthyronins im Serum gesucht werden. Derartige

Untersuchungen wurden von MITCHELL et al. (3), STERLING und TABACHNIK (4), HORSTER und KLEIN (5) und GODDEN et al. (6) angegeben, die Austauscherharze verwandten, um das nicht serumproteingebundene Trijodthyronin zu binden und zu bestimmen (Resin-Uptake-Test).

Technisch relativ einfach und wenig zeitraubend ist die In-vitro-Bestimmung der Serumproteinbindung von zugesetztem L-Trijodthyronin-<sup>131</sup>Jod ( $T_3$ -<sup>131</sup>) mittels Dextrangelfiltration durch RABINOWITZ (7, 8), STUMPF und GRAUL (9) und SCRIBA, LANDGRAF und Mitarbeiter (10-15). Weitere Vorteile der Methode liegen in der Möglichkeit der Abtrennung und Bestimmung des im zugesetzten  $T_3$ -<sup>131</sup> befindlichen <sup>131</sup>Jodids sowie in der voneinander unabhängigen Bestimmung des sog. freien und proteingebundenen Anteils an L-Trijodthyronin-<sup>131</sup>Jod.

Die Methode der Dextrangelfiltration mißt nun keineswegs den physiologischerweise proteingebundenen und freien Anteil des Hormons, wie das SHAPIRO und RABINOWITZ (7), CUARON (16 17) und STUMPF und GRAUL (9) zunächst annahmen. Diese Autoren übernahmen die Vorstellung, daß das Dextrangel lediglich als Molekülsieb wirke. Untersuchungen aus unserer Klinik (10-15) zeigten jedoch, daß sich das reversibel gebundene L-Trijodthyronin kompetitiv zwischen Serumproteinen und Dextrangel verteilt. Der sog. freie Anteil an  $T_3$  liegt also dextrangelgebunden vor und ist von der Sephadexmenge in der Säule insofern abhängig, als man bei zunehmender Sephadexmenge einen steigenden Anteil an sog. freiem  $T_3$ -<sup>131</sup> findet.

Da das Dextrangel mit den Serumproteinen um das zugesetzte L-Trijodthyronin kompetiert, entsprechen damit die Verhältnisse denen des RBC- $T_3$ -Uptake-Tests. Die Dextrangelmengen wurden bei unserem Test (10-15) so gewählt, daß die Werte der  $T_3$ -Bindung

dem Erythrocyten-Test entsprechen und die Gelfiltration somit als Modell physiologischer Verhältnisse aufgefaßt werden kann, bei denen ja auch die Schilddrüsenhormone zwischen Proteinen (extracelluläre Bindungsstätten) und cellulären Bindungskomponenten verteilt sind.

Zur Zeit ist es also noch nicht möglich oder üblich, den tatsächlich physiologischerweise vorhandenen freien Anteil an  $T_3$  zu bestimmen. Auch bei Dialyseversuchen (18, 19) besteht kein physiologisches Verhältnis zwischen extracellulären und cellulären Bindungsstätten und dem wässrigen Verteilungsmedium für Schilddrüsenhormone.

Es ist bekannt, daß die Wirkung eines Hormons nicht von dem Gesamtgehalt im Blut, sondern von der Konzentration des nicht proteingebundenen Anteils abhängt. Der Anteil des an die Zellen gebundenen Hormons ist vermutlich entscheidend für die Wirkung auf den Zellstoffwechsel. Die periphere L-Thyroxin-Konzentration ist mindestens zehnmal so hoch wie die des L-Trijodthyronins (20), die Konzentration an freiem  $T_3$  jedoch ungefähr zehnmal höher als die des freien  $T_4$  (14, 19). Die Wirkung des L-Trijodthyronins auf den Basalstoffwechsel ist rascher und stärker als die von L-Thyroxin (21-23). Es kommt demnach dem freien bzw. dem sog. freien L-Trijodthyronin eine erhebliche physiologische Bedeutung zu.

Für uns galt es nun, die Bestimmung des proteingebundenen und sog. freien, also dextrangelgebundenen Anteils an zugesetztem radioaktiv markierten L-Trijodthyronin mittels Dextrangelfiltration gegenüber früher angegebenen Verfahren weiter zu vereinfachen, um diese Methode als einfachen Routinetest in der klinischen Diagnostik benutzen zu können. Das wäre für die Klinik von besonderer Wichtigkeit.

da der  $T_3$ -Test im Gegensatz zu den üblichen Verfahren (PBI-127,  $^{131}\text{I}$ -Jod-Speicherungstest) nicht von Störfaktoren, wie vorangegangene schilddrüsenpezifische Behandlung und Jodapplikation, beeinflusst wird.

Wir verwendeten das  $^{125}\text{I}$ -Jod-markierte L-Trijodthyronin ( $T_3$ -125), das wegen seiner relativen chemischen Stabilität und der längeren Halbwertszeit (60 Tage) des Isotops erhebliche Vorteile gegenüber dem  $^{131}\text{I}$ -Jod-Trijodthyronin ( $T_3$ -131) zeigte. Es wurden Patienten mit normaler, gesteigerter und verminderter Schilddrüsenfunktion untersucht und diese Werte mit den Ergebnissen bei Verwendung von  $T_3$ -131 verglichen. Die Arbeit beschreibt weiter methodische Untersuchungen zur Verbesserung der Technik. Ein besonderes Kapitel widmeten wir der Prüfung der Zuverlässigkeit der Methode bzw. deren Störung durch verschiedene Reinheitsgrade der Reagentien, die chromatographisch geprüft wurden. Im Mittelpunkt aber stand die Bedeutung der Bestimmung der Bindungsverhältnisse des  $T_3$ -125 mittels Dextrangelfiltration für ausgewählte klinische Fragestellungen, wie Veränderungen der Schilddrüsenfunktion unter Behandlung mit Antioovulantien und bei Adipositas. Schließlich bedienten wir uns dieser Methode, um genauere Aussagen über den Grad der Steigerung der Schilddrüsenfunktion bei hyperthyreoten Patienten machen zu können, bei denen histologische Myelotomiebefunde und Veränderungen des Elektroencephalogramms im Rahmen klinischer Untersuchungsreihen (24, 25) interessieren.

## II. METHODE der Dextrangelfiltration

### 1. Theorie

Dextrangel besteht aus hydrophilen Polysaccharidketten, die untereinander vernetzt sind. Im Gegensatz zu den Austauscherharzen enthält es keine oder kaum aktive Ionengruppen. Es ist wasserunlöslich, besitzt aber eine bemerkenswerte Affinität zu Wasser, der polare Charakter beruht auf der großen Anzahl an Hydroxylgruppen des Gels (26).

Das chromatographische Trennverfahren basiert auf der eingeschränkten Diffusion der Moleküle im Dextrangel. Die Flüssigkeit, die die Gelpartikel bei der Quellung aufgenommen haben, ist als Lösungsmittel für Moleküle verschiedener Größe in einem vom Vernetzungsgrad des Gels abhängigen Maß verfügbar. Auf diese Weise ist die Verteilung gelöster Stoffe auf das Lösungsmittel innerhalb und außerhalb der Gelpartikel durch den im Inneren zugänglichen Volumenanteil und durch das äußere Volumen bestimmt (26).

Bei den verschiedenen Geltypen, die sich durch ihren Vernetzungsgrad unterscheiden, läßt sich für jeden Stoff für die Verteilung zwischen den beiden Phasen (inneres und äußeres Wasser) ein Verteilungskoeffizient definieren, der eine Funktion der Molekülgröße und näherungsweise des Molekulargewichtes ist.

Die Wirkung des Dextrangels ist also die eines Molekülsiebes, die Stoffe werden nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt, jedoch mit der Einschränkung, daß auch Adsorptionsvorgänge eine Rolle spielen; so ist es z. B. bekannt, daß das Gel aromatische Verbindungen mehr oder weniger fest adsorbiert und wie in der EINLEITUNG schon erwähnt, kompetitiv in die Serumproteinbindungsverhältnisse des Trijodthyronins eingreift.

## 2. Präparation der Dextrangelsäule:

Wenn nicht anders beschrieben, wurden Standardsäulen ( $h = 23$  cm,  $d = 0,8$  cm) mit je 2 g des stark vernetzten Dextrangels Sephadex G<sub>25</sub> fine (Fa. Pharmacia, Uppsala/Schweden), das zuvor 1 - 2 Stunden in Aqua bidest. gequellt wurde, ca. 18 cm hoch gefüllt. Die Säulen enthielten vor der Ausflußkapillare eine Schicht Glaswolle, darüber eine ca. 1 cm hohe Schicht Glasperlen ( $d = 0,1$  cm), darauf das Gelbett, dessen untere 3 - 5 cm durch Sedimentation bei verschlossener Ausflußkapillare ( $d = 0,3$  cm) eingefüllt wurden. Die Säule wurde an ein Puffervorratsgefäß (Filtrationsdruck ca. 1 m Wassersäule) angeschlossen und mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer  $p_H$  7,4 gespült, bis sich das Gelbett stabilisiert hatte (ca. drei Bettvolumen Puffer). Zur Vermeidung bakterieller Besiedlung der Säulen wurden diese täglich frisch bereitet.

## 3. Inkubationsgemisch von Trijodthyronin-<sup>125</sup>Iod und Serum

0,2 mCi L-Trijodthyronin-<sup>125</sup>Iod (in ca. 1 ml 50%iger wässriger Propylen-Glykol-Lösung. Trijodthyroningehalt 10 - 18  $\mu$ g, Radiochemical Centre, Amersham/England) wurden mit sterilem 0,06 M Natriumphosphatpuffer  $p_H$  7,4 auf ein Gesamtvolumen von 200 ml gebracht (Arbeitsstandard). Diese Lösung (1  $\mu$ Ci  $T_3$ -<sup>125</sup>Iod und 0,05 bis 0,09  $\mu$ g  $T_3$  pro ml) wurde in Bleimänteln im Kühlraum (+4 °C) bis zum Gebrauch aufbewahrt, der Reinheitsgrad wurde wiederholt chromatographisch überprüft (s. u.).

Falls nicht anders vermerkt, wurden 0,5 ml Arbeitsstandard (0,2 bis 0,5  $\mu$ Ci), 1 ml 0,01 M Natriumphosphatpuffer  $p_H$  7,4 und 1,5 ml Serum im Schüttelbad bei 37 °C 15 Minuten lang inkubiert, was zur Equilibrierung der Trijodthyroninbindung vollkommen ausreicht (9). Von dem Gesamtvolumen von 3 ml wurde nach Beendigung der Inkubation je 1 ml in ein Meßröhrchen zur Bestimmung der Gesamtaktivität gebracht und 1 ml zur Dextrangelfiltration verwandt.

#### 4. Auftragen der Proben

Nach Absaugen des über dem Dextrangelbett stehenden Puffers wurde jeweils 1 ml von dem Inkubationsgemisch vorsichtig aufgetragen und dabei vermieden, daß die Oberfläche des Gels aufgewirbelt wurde. Nach Einsinken der Probe wurde zweimal mit 1 ml Puffer nachgewaschen und dabei die Säuleninnenwand über dem Gelbett abgespült. Nach Auftragen des zweiten ml Puffers wurde sofort ein Vorratsgefäß mit 0.01 M Natriumphosphatpuffer  $p_{\text{H}} 7,4$  an die Säule angeschlossen (Filtrationsdruck ca. 1 m Wassersäule) und mit dem Fraktionssammeln begonnen.

#### 5. Fraktionssammeln

Hier kamen zwei Methoden zur Anwendung:

##### a) Chromatopart-Technik

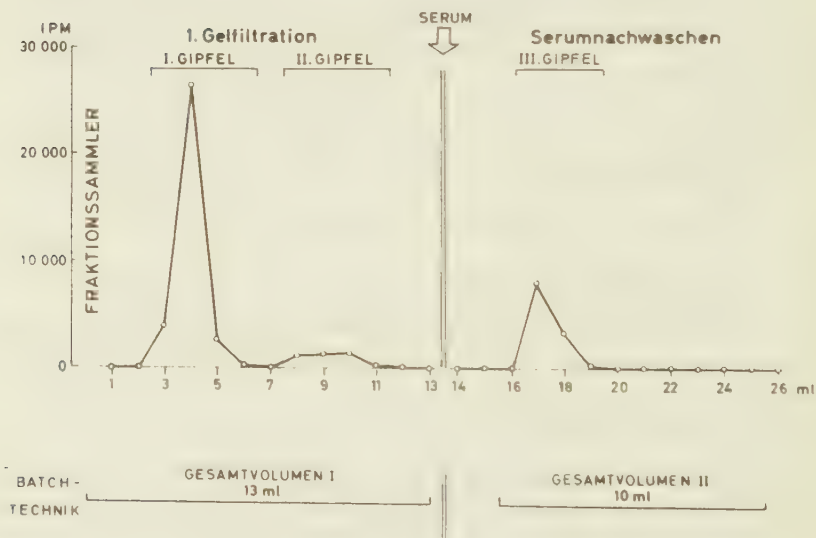
Das Eluat der zu untersuchenden Proben wurde mit einem automatischen Fraktionssammler in 1 ml-Fractionen gesammelt oder

##### b) BATCH-Technik

Das Eluat wurde in graduierten Röhrchen bis zu einem Gesamtvolumen I gesammelt (13 ml). Dabei waren die Volumina so gewählt, daß die jeweils interessierenden Gipfel, proteingebundenes  $T_3$ - $^{125}\text{I}$  = I. Gipfel und  $^{125}\text{Jodid}$  = II. Gipfel nicht getrennt erhalten wurden (Abb. 1). Von dem Gesamtvolumen wurde jeweils 1 ml nach kräftiger Durchmischung in ein Meßröhrchen gebracht. Der nicht abgetrennte  $^{125}\text{Jodid}$ anteil in % mußte für jede Versuchsreihe einmal mittels Chromatopart-Technik bestimmt werden. Bei gleicher Genauigkeit bedeutet die BATCH-Technik eine wesentliche technische Vereinfachung (Lit. wie oben).

Abb. 1: Schematische Darstellung der Fraktionierung (Chromatopart-Technik) und der BATCH-Technik bei Dextran-Gelfiltration

Inkubation von L-Trijodthyronin-<sup>125</sup>Jod und Serum, Dextrangelfiltration, Serumnachwaschen der Säule und Messung der Radioaktivität wie unter "METHODEN" beschrieben



## 6. Serumnachwaschen

Wie oben angeführt, wird ein Teil des L-Trijodthyronins an das Dextran adsorbiert. Dieses sog. freie T<sub>3</sub> kann durch Puffer nicht eluiert werden, mit 2 ml Normalserum jedoch wird es vollständig aus der Säule entfernt (14). Dazu wurde im Anschluß an die Gelfiltration von 1 ml

des Inkubationsgemisches 2 ml Normalserum nach Absaugen des Pufferüberstandes auf das Gel aufgetragen. Nach Einsickern des Serums wurde 1 ml Elutionspuffer unter Abspülen der Säuleninnenwand aufgetragen und anschließend sofort das Puffervorratsgefäß angeschlossen und das Filtrat mittels Chromatopart-Technik oder BATCH-Technik gesammelt (10 ml), so daß sich ein III. Gipfel ergab (Gesamtvolumen II Abb. 1).

## 7. Zähltechnik

Es wurden immer 1 ml-Proben in Röhrchen genau gleicher Größe, wie sie der Chromatopart-Technik verwendet wurden, gezählt, so daß gleiche Zählgeometrie gewährleistet war. Glaswaren, die mit <sup>125</sup>Jod in Berührung kamen, waren vorher mit Kaliumjodidlösung gesättigt worden. Alle Glaswaren wurden mit Dichromatschwefelsäure und Aqua bidest gespült und die Nullwerte laufend überprüft.

Als Zählgerät benutzten wir den automatischen Probenwechsler der Deutschen Picker-GmbH<sup>+)</sup> . Alle Proben wurden mit 10 Minuten Zeitvorwahl gezählt, um den statistischen Fehler möglichst klein zu halten. Der Nulleffekt betrug 6 bis 10 IPM, die Impulsausbeute  $\frac{\text{IPM} \times 100}{\text{DPM}}$  lag bei 25 %.

## 8. Berechnung

- a) Bei der Verwendung des Fraktionssammlers wurden 2 Aktivitätsgipfel erhalten, die durch ein nahezu aktivitätsfreies Intervall von 1 bis 2 Röhrchen getrennt waren. Nach Abzug der Nulleffekte von den erhaltenen Impulsraten berechnet sich der jeweilige prozentuale Anteil des <sup>125</sup>Jodids, des proteingebundenen und sog freien

---

+) Herrn Dr. HEUER (I. Medizinische Universitätsklinik München) danke ich für die Möglichkeit, dieses Gerät benutzen zu dürfen.

$T_3$ -125, nach den Gleichungen:

(1)  $^{125}$ Jodid in % der Gesamtaktivität =

$$\frac{\sum \text{IPM des II. Gipfels} \times 100}{\sum \text{IPM der Gesamtaktivität}}$$

(2) proteingebundenes  $T_3$ -125 in % des Gesamt- $T_3$ -125 =

$$\frac{\sum \text{IPM des I. Gipfels} \times 100}{\sum \text{IPM der Gesamtaktivität} - \sum \text{IPM II. Gipfel}}$$

(3) sog. freies  $T_3$ -125 in % des Gesamt- $T_3$ -125 =

$$\frac{\sum \text{IPM des III. Gipfels} \times 100}{\sum \text{IPM der Gesamtaktivität} - \sum \text{IPM II. Gipfel}}$$

- b) Bei Anwendung der BATCH-Technik wurden in einem Gesamtvolumen von 13 ml der I. und II. Gipfel zusammen eluiert (Abb. 1) und davon eine 1 ml-Probe gezählt. Daher mußten die gefundenen Impulsraten nach Abzug des Nulleffektes mit 13 multipliziert werden.

Bei der relativen Stabilität des L-Trijodthyronin- $^{125}$ Jods bleibt der für jeden Versuchstag mittels Chromatopart-Technik ermittelte Jodidgehalt der Lösung über mindestens eine Woche konstant, wie sich in unseren Versuchsreihen gezeigt hat. So errechnen sich die jeweiligen tatsächlichen Impulsraten der Jodidgipfel durch Multiplikation des im Chromatopart-Versuch bestimmten prozentualen Anteils von  $^{125}$ Jodid mit der jeweiligen Gesamtaktivität.

proteingebundenes  $T_3$ -125 in % des Gesamt- $T_3$ -125 =

$$\frac{[\sum \text{IPM des Eluat I} - \sum \text{IPM des errechneten II. Gipfels}] \times 100}{[\sum \text{IPM der Gesamtaktivität} - \sum \text{IPM des errechneten II. Gipfels}]}$$

## 9. Statistik

Die Berechnung von Mittelwerten ( $\bar{x}$ ), der Standardabweichung  $s$ , des Standard Error (S.E.), das ist gleich der Standardabweichung des Mittelwertes  $\frac{s}{\sqrt{n}}$  und der Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte ("t" Test) erfolgte nach den üblichen statistischen Methoden (27). So wurde aus den gefundenen Einzelwerten zunächst der Mittelwert  $\bar{x}$  gebildet.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

$x_1, x_2, x_n$  = Einzelwerte

$n$  = Anzahl der Werte

Die Streubreite der Einzelwerte = Standardabweichung wurde über die Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert ( $\sum (x_i - \bar{x})^2$ ) bestimmt.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$x_1 - \bar{x} = \bar{x} - x_1$$

$$x_2 - \bar{x} = \bar{x} - x_2$$

$$x_n - \bar{x} = \bar{x} - x_n$$

Zur Beurteilung der Genauigkeit des Mittelwertes wurde der mittlere Fehler des Mittelwertes = Standard Error (S.E.) berechnet.

$$\text{S.E.} = \frac{\text{Streuweite der Einzelwerte}}{\sqrt{n}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Die Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte wurde mit dem "t" Test kalkuliert.

$$t = \frac{\bar{x}_x - \bar{x}_y}{\sqrt{\frac{\frac{n_x}{n_x} + \frac{n_y}{n_y} - 2}{\frac{n_x}{n_x} + \frac{n_y}{n_y} - 2} \left[ (S.E._x)^2 \cdot \left( \frac{n_x - 1}{n_y} \right) + (S.E._y)^2 \cdot \left( \frac{n_y - 1}{n_x} \right) \right]}$$

$\bar{x}_x, \bar{x}_y$  = die Mittelwerte zweier Untersuchungsreihen

Waren bei den beiden Reihen die Anzahl der Werte gleich, konnte die vereinfachte Gleichung für t angewandt werden

$$t = \frac{\bar{x}_x - \bar{x}_y}{\sqrt{(S.E._x)^2 + (S.E._y)^2}}$$

Die Zahl der Freiheitsgrade "n" ist einfach 2 weniger als die Gesamtzahl der Werte " $n = n_x + n_y - 2$ "

Aus den gefundenen t-Werten und der Anzahl der Freiheitsgrade ("n") konnte nun aus der Tabelle der Signifikanzschranken der Student-Verteilung die Signifikanzwahrscheinlichkeit p abgelesen werden (27). Bei einem p unter 0,05 konnten die Mittelwerte zweier Untersuchungsreihen als schwach signifikant unterschieden angenommen werden.

Schwankten die Ausgangswerte einer Untersuchungsgruppe sehr stark, so daß die Differenz der Mittelwerte der Ausgangswerte und weiterer Bestimmungen nach Behandlung nicht signifikant war, so wurde zwischen den verschiedenen Werten der einzelnen Versuchspersonen die Differenz gebildet. Das "t" ist in diesem Fall einfach der Mittelwert der Einzeldifferenzen ( $\bar{x}$ ) dividiert durch seinen Standard Error.

$$"t" = \frac{\bar{x}}{S.E.}$$

$\bar{x}$  = mittlere Differenz

Die Freiheitsgrade berechnen sich dann einfach als Zahl der sich entsprechenden Werte minus 1

$$"n" = n - 1$$

Zur Bestimmung der Korrelation zweier veränderlicher Größen wurde der Korrelationskoeffizient  $r$  nach der Formel gebildet (27)

$$r = \frac{\sum (x_v y_v - \bar{x}\bar{y})}{\sqrt{\left[\sum (x_v - \bar{x})^2\right] \cdot \left[\sum (y_v - \bar{y})^2\right]}}$$

$x$  = Abszisse,  $x, y$  = Einzelwertpaare,  $\bar{x}, \bar{y}$  = Mittelwerte

Die Steigung  $b$  der Geraden (Regressionskoeffizient) wurde nach der Formel berechnet (27).

$$b = \frac{\sum (x_v \cdot y_v - \bar{x} \cdot \bar{y})}{\sum (x_v - \bar{x})^2}$$

## 10. Verdrängungsversuche

### a) mit L-Trijodthyronin

Im Serum liegen nicht markiertes Hormon und dessen bindende Proteine vor (28-33). Bei Zugabe von radioaktiv markiertem Hormon wird sich dieses nach dem Massenwirkungsgesetz gleichmäßig zwischen frei und gebunden vorliegendem nichtmarkiertem Hormon verteilen. Bei weiterer Zugabe von "kaltem" Hormon wird auch dieses mit dem schon vorliegenden Hormon um den Sitz am Protein in Konkurrenz treten und die Menge proteingebundenen markierten Hormons also prozentual abnehmen. Das Serum wurde also sowohl mit markiertem L-Trijodthyronin-<sup>125</sup>Jod allein, als auch mit diesem und mit nicht markiertem L-Trijodthyronin-<sup>127</sup>Jod inkubiert.

Die dem Serum zugesetzten 0,2 bis 0,5  $\mu\text{Ci}$  L-Trijodthyronin-<sup>125</sup>Jod hatten einen Gehalt von 0,025 bis 0,045  $\mu\text{g}$   $\text{T}_3$  pro ml, so daß die zugesetzte L-Trijodthyroninmenge in der Größenordnung der physiologischerweise im Serum bereits vorhandenen  $\text{T}_3$ -Menge lag und daher nicht als "Tracerdosis" im eigentlichen Sinne gelten darf.

Im Verdrängungsversuch wurden dem Inkubationsgemisch ( $\Sigma V = 3,0$  ml) statt 1 ml 0,01 M Natrium-Phosphat-Puffer  $\text{p}_\text{H}$  7,4 1,5  $\mu\text{g}$   $\text{T}_3$ -<sup>127</sup> in 1 ml Puffer zugegeben; das Serum enthielt also neben den 0,008 bis 0,015  $\mu\text{g}$   $\text{T}_3$ -<sup>125</sup> noch 0,5  $\mu\text{g}$   $\text{T}_3$ -<sup>127</sup> pro ml.

### b) mit Thyroxin

Es wurde berichtet, daß für die Höhe des Anteils an sog. freien L-Trijodthyronin im Serum im wesentlichen die L-Thyroxin-Konzentration verantwortlich ist (34, 35). Die Bindung des D- und L-Thyroxins an Protein, die nicht stereospezifisch ist (36), ist bekanntlich wesentlich stärker als die des L-Trijodthyronins, so

daß die Annahme naheliegt, daß Thyroxin stark kompetitiv auf die L-Trijodthyroninbindung an Protein wirken und so zu einer erheblichen Verdrängung des  $T_3$ -125 führen müßte.

In  $T_4$ -Verdrängungsversuchen wurden dem Serum ( $\Sigma V = 3 \text{ ml}$ ) neben den 0,2 bis 0,5  $\mu\text{Ci } T_3$ -125 noch DL- $T_4$  in steigenden Mengen von 0,015 bis 1,5  $\mu\text{g}$  in 1 ml 0,01 M Natrium-Phosphat-Puffer  $p_H 7,4$  angeboten.

c) Herstellung der "kalten"  $T_3$ - und  $T_4$ -Lösungen

Jeweils 1,5 mg  $T_3$  bzw.  $T_4$  (Fa. Fluka AG, Schweiz) wurden in einem Liter 0,01 M-Natrium-Phosphat-Puffer  $p_H 7,4$  gelöst. Wegen der schlechten Löslichkeit dieser Substanzen wurden die Lösungen anfangs im Schüttelbad bei ca.  $40^\circ\text{C}$  geschüttelt und erst nach 12 Stunden verwendet. In späteren Versuchen wurden die Lösungen über Nacht mittels Magnetrührer "geschüttelt", was eine bessere Löslichkeit der Substanzen bewirkte und eine bessere Reproduzierbarkeit der Werte ergab.

Um eine bakterielle Zersetzung der Lösungen möglichst auszuschalten, wurden diese mindestens alle acht Tage frisch bereitet, die Reinheit wurde chromatographisch überprüft (s. u.).

### III. ERGEBNISSE der Verdrängung mit Thyroxin

Wie unter "METHODEN" angegeben, wurden 0,5 ml Arbeitsstandard L-Trijodthyronin-<sup>125</sup>Jod und 1,5 ml Serum

- in Versuch I mit 1 ml 0,01 M Natriumphosphatpuffer  $p_H$  7,4,  
in Versuch II mit 1,5  $\mu$ g nicht markiertem L-Trijodthyronin in  
1 ml Puffer und  
in Versuch III mit steigenden Konzentrationen nicht markierten  
DL-Thyroxins (0,015-0,075-0,15-0,40-0,75-1,5  $\mu$ g)  
in 1 ml Puffer inkubiert ( $\Sigma V = 3$  ml).

Bei der Dextrangelfiltration (s. o.) zeigte sich überraschenderweise, daß die Verdrängung des proteingebundenen  $T_3$ -<sup>125</sup> durch zugesetztes L-Trijodthyronin wesentlich stärker ist als die durch zugegebenes DL-Thyroxin. Selbst bei Zugabe von 0,75  $\mu$ g  $T_4$ , der Hälfte der in unseren üblichen  $T_3$ -Verdrängungsversuchen verwendeten Menge, liegen die Werte des prozentualen Anteils an proteingebundenem  $T_3$ -<sup>125</sup> noch in der Fehlerbreite der Bestimmung von Versuch I; 0,75  $\mu$ g  $T_4$  pro  $\Sigma V = 3$  ml, führen also noch zu keiner bzw. keiner wesentlichen Verdrängung (Abb. 2)

Inkubation von L-Trijodthyronin-<sup>125</sup>Jod, Serum und L-Trijodthyronin-<sup>127</sup>Jod (T<sub>3</sub>-<sup>127</sup>-Verdrängung ●●●●●) bzw. DL-Thyroxin-<sup>127</sup>Jod (T<sub>4</sub>-<sup>127</sup>-Verdrängung ○○○○). Dextrangelfiltration, Messung der Radioaktivität und Berechnung wie unter "METHODEN" beschrieben.



#### IV. CHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON TRIJODTHYRONIN, THYROXIN UND JODID

Die Chromatographie ist eine der leistungsfähigsten, heute bekannten Trennungsmethoden. Sie erlaubt eine Trennung nahe verwandter Stoffe, die auf keinem anderen Wege erreicht werden kann. Schon geringe Unterschiede im Molekülaufbau bewirken eine verschiedene Wandungsgeschwindigkeit im Chromatogramm, der Nachweis der Substanzen, qualitativ und quantitativ, erfolgt also durch räumliche Auftrennung. Neben der oben beschriebenen Trennung der Stoffe nach ihrer Molekülgröße (Dextrangel als Molekülsieb) spielen die im folgenden beschriebenen Mechanismen dabei eine Rolle:

Adsorptionschromatographie: Wenn sich Stoffe, die in einer Phase gelöst sind, an der Grenzfläche dieser Phase zu einer zweiten anreichern, so spricht man von Adsorption. Sind die Grenzflächen, an denen die Phasen zusammenstoßen, sehr ausgedehnt, so erlangen diese Vorgänge große Bedeutung. Kolloidale Lösungen enthalten mindestens zwei verschiedene Phasen, von denen sich die eine, die disperse Phase, in der anderen, dem Dispersionsmittel, im Zustand feiner Verteilung befindet. Da die gesamte Oberfläche umso größer ist, je feiner die Aufteilung eines Stoffes ist, nimmt die Grenzfläche für Teilchengrößen, wie sie bei kolloidalen Systemen vorkommen (1-100  $\mu$ ), recht hohe Werte an. Zerteilt man z.B. 1 cm<sup>3</sup> eines Stoffes in Kügelchen von 0,1  $\mu$  Durchmesser, so mißt deren gesamte Oberfläche 60 m<sup>2</sup>. Es ist daher verständlich, daß bei kolloidalen Systemen, Solen und Gelen, die Adsorptionsvorgänge von besonderer Bedeutung sind.

Die Möglichkeit, durch Adsorption Stoffe zu trennen, beruht auf deren verschiedener Affinität zum Adsorptionsmittel oder Adsorbens. Die Menge des von einer bestimmten Oberfläche aus einer Lösung aufgenommenen Stoffes hängt außer von der Natur des Adsorptions- und

Lösungsmittels und der Temperatur auch von seiner Konzentration ab. Trägt man in ein Koordinatensystem die bei einer bestimmten Temperatur adsorbierte Menge Stoff gegen die Konzentration auf, mit der sich der adsorbierte Stoff im Gleichgewicht befindet, so erhält man eine gegen die Konzentrationsachse konkave parabelartige Kurve, die sog. Adsorptionsisotherme. Ihr Verlauf zeigt, daß bei steigender Konzentration ein verhältnismäßig geringerer Anteil des Stoffes adsorbiert wird, die Oberfläche strebt einer Sättigung zu (37).

Zur chromatischen Trennung auf Säulen und Dünnschichten wird die Lösung des zu trennenden Stoffgemisches auf das Adsorbens aufgetragen und dieses anschließend durch ein Lösungsmittel eluiert ("Entwicklung" des Chromatogramms). Die einzelnen Stoffe wandern nun meist in gut abgegrenzten Zonen das Adsorbens entlang nach unten oder oben (absteigende bzw. aufsteigende Chromatographie), am schnellsten diejenigen, bei denen die Affinität zum Adsorbens am geringsten ist. Es liegt also eine unbewegliche, stabile Phase, das Adsorbens, und eine flüssige, mobile Phase, das Lösungs- oder Laufmittel, vor. Durch die Wahl der Adsorbentien und Lösungsmittel kann die Chromatographie an die Trennung der verschiedensten Stoffe angepaßt werden.

Verteilungschromatographie: Überschichtet man die wässrige Lösung einer Substanz mit einer mit ihr nicht unbegrenzt mischbaren organischen Flüssigkeit und schüttelt um, so verteilt sich die Substanz zwischen den beiden Phasen gemäß den Beziehungen des NERNST'schen Verteilungssatzes:

$$\frac{c_1}{c_2} = \text{konstant (Verteilungskoeffizient)}$$

$c_1$  = Konzentration der Substanz in Phase 1

$c_2$  = Konzentration der Substanz in Phase 2

Ordnet man die wässrige Phase stationär an, indem man sie von Silicagel, Kartoffelstärke oder Cellulosepulver aufsaugen läßt, und gibt man die Substanz auf eine so zubereitete Säule und läßt die organische mobile Phase langsam hindurchfließen, so wandert die Substanz mit einer Geschwindigkeit abwärts, die eine Funktion ihres Verteilungskoeffizienten ist. Die Möglichkeit, verteilungschromatographisch Stoffe zu trennen, beruht also auf deren verschiedenen Verteilungskoeffizienten.

An Stelle der obengenannten Bindemittel für die wässrige Phase verwendet man heute meist Filterpapiere. Der Verteilungsvorgang auf dem Filterpapier spielt sich im Prinzip zwischen dem von der Cellulose während der Sättigungszeit aus der feuchten Atmosphäre aufgenommenen Wasser als der stationären Phase und der durch Capillarität und Schwerkraft wandernden mobilen Phase ab. Daß die mobile Phase bzw. das Fließmittel auch aus mehreren Komponenten bestehen kann, ist unten ausgeführt.

## 1. METHODE der Dünnschichtchromatographie

### a) Beschichtung der Platten

Bei den Versuchen ist streng darauf zu achten, daß nur fett- und jodfreie Platten verwendet werden. Daher wurden alle Glasplatten mit Dichromat-Schwefelsäure-Aqua dest. gewaschen. Zur Beschichtung der "CAMAG"-Trägerplatten für Dünnschichtchromatographie, Größe 20 x 20 cm, wurden 15 g Kieselgel HF<sub>254</sub> nach STAHL der Fa. E. Merck AG mit 55 ml einer wässrigen Äthanol-lösung (Äthanol: Aqua dest. (V/V) = 8:3) klumpenfrei glattgerührt und mit dem "DESAGA"-DC-Streugerät in 0,25 mm Schichtdicke aufgetragen. So konnten in einem Arbeitsgang auf einer

Schablone 5 Platten beschichtet werden. Anfangs wurden die beschichteten Platten 2 Stunden im Trockenschrank bei 90°C, später über Nacht an der Luft getrocknet (37).

b) Auftragen der zu trennenden Substanzen

Zum Aufbringen der Substanzen 3, 3', 5-Trijod-L-Thyronin und DL-Thyroxin, beide von der Fa. Fluka AG, Schweiz, wurden diese in 0,1 N NaOH gelöst; eine wässrige Jodidlösung wurde aus Kaliumjodid p. A. der Fa. Merck AG angesetzt. Es wurden jeweils 4 µl einer Lösung aufgetragen, was einer Menge von je 5 µg T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> und KJ entsprach, falls nicht anders angegeben. Mit einer Mikropipette wurden 1,5 cm vom unteren Plattenrand entfernt möglichst kleine Flecken der einzelnen Substanzen und eines entsprechenden Gemisches aufgetragen. Jede Probe wurde jeweils doppelt aufgetragen, und zwar derart, daß dieselbe Substanz einmal mehr am Plattenrand, das andere Mal mehr in Plattenmitte lief. Der Abstand der Flecke untereinander betrug jeweils 2 cm, der Abstand vom seitlichen Plattenrand 3 cm. Damit wurde bezweckt, das Randphänomen auszuschalten, da die Substanzen am Rand eventuell schneller laufen (37).

c) Entwicklung der Platten

Nach Abdampfen des Lösungsmittels der aufgetragenen Substanzen (ca. 1 Stunde an der Luft) wurden die Chromatographieplatten in die "DESAGA"-Entwicklungskammer (Größe 21 x 21 x 5 cm) gebracht. Diese wurde vorher vollständig mit Filterpapier ausgekleidet, 100 ml eines Fließmittels eingebracht und die Kammer anschließend kräftig geschüttelt (Kammersättigung). Dadurch wird erreicht, daß das Fließmittel während der Entwicklung des Chromatogramms nicht von der Platte abdampfen kann, woraus besseres und schnelleres Aufsteigen des Fließmittels - vor allem

in einer annähernd geraden Front - resultiert. Nach Sättigung der Kammer wurden jeweils 2 Platten V-förmig in das Fließmittel gestellt, wobei die Platten ca. 0,3 cm tief in die Laufmittelpfütze eintauchten. Von besonderer Wichtigkeit ist das luftdichte Verschließen der Kammer mittels eines plangeschliffenen Deckels, der zusätzlich mit einem Gewicht beschwert wurde. Die Entwicklung des Chromatogramms wurde bei möglichst konstanter Temperatur und diffusem Tageslicht vorgenommen, um annähernd gleiche Versuchsbedingungen zu gewährleisten (37). Die Entwicklung wurde unterbrochen, wenn die Fließmittelfront eine Strecke von ca. 17 cm zurückgelegt hatte, was je nach Laufmittel 2 bis 4 Stunden in Anspruch nahm.

d) Nachweis der Substanzen (38, 39)

Nach Abschluß der Entwicklung des Chromatogramms wurden die Platten solange getrocknet, bis das Fließmittel vollständig abgedampft war. Hierauf konnten die Substanzen mit der Cer-IV-Sulfat-Arsenit-Reaktion nachgewiesen werden;

aa) Cer (IV)-Sulfatlösung; 10 g Cer (IV)-Sulfat (Fa. Merck AG) wurden in 100 ml N-Schwefelsäure eingegeben, die zuvor auf 0 bis 5 °C abgekühlt worden war. Das Gemisch wurde noch ca. 1 Stunde kühl gehalten und anschließend gefiltert. Die nun klare Lösung wurde bis zum Gebrauch im Eisschrank aufbewahrt (Haltbarkeit ca. 2 Wochen).

bb) Arsenitlösung; 5 g Natriumarsenit (Fa. Merck AG) wurden in 30 ml N-NaOH gelöst. Diese Lösung wurde tropfenweise unter Rühren in 65 ml 2N-Schwefelsäure, die vorher auf 0 bis 5 °C abgekühlt worden war, eingebracht, worauf mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt wurde.

Vor Gebrauch wurden gleiche Volumina von Lösung aa) und bb) gemischt und mittels eines feinen Zerstäubers auf das Chromato-

gramm aufgesprüht. Dieses wird dadurch gleichmäßig gelb gefärbt, Stellen, an denen jodhaltige Verbindungen vorliegen, werden entfärbt. Um eine längere Haltbarkeit und besseren Kontrast der Farbreaktionen zu erzielen, wurde das Chromatogramm anschließend noch vor dem Trocknen zusätzlich mit einer 1%igen Lösung von o-Phenylendiamin in Aceton besprüht - die weißen Flecken an den Stellen jodhaltiger Verbindungen heben sich von dem jetzt braun gefärbten Chromatogramm deutlich ab<sup>+</sup>.

Jodid konnte zusätzlich mit einer 1%igen Palladium-II-Chloridlösung in Aceton (mit wenigen Tropfen konzentrierter Salzsäure) nachgewiesen werden.

e) Trennung der Anteile des Trijodthyronin-<sup>125</sup>Jods

Zur chromatographischen Analyse wurden 5 bis 20 µl T<sub>3</sub>-<sup>125</sup>Arbeitsstandard wie oben beschrieben auf die Dünnschicht aufpipettiert und wie oben angegeben entwickelt. Anschließend wurde das Chromatogramm mittels des Kunststoffsprühlackes TL-SA der Fa. Camag von der Platte abgezogen, mit einer Klebefolie verstärkt und in 0,5 oder 1 cm breite Streifen zerschnitten. Diese wurden zur Messung der Radioaktivität in Spezialgläsern im automatischen Probenwechsler der Deutschen Picker-GmbH ausgezählt.

f) Berechnung

Dünnschichtchromatogramme werden durch Angabe des Verhältnisses der von den Substanzen zurückgelegten Strecken zur zurückgelegten Strecke der Front des Fließmittels - das sind die sog.

- 
- + Nach Entwicklung des Chromatogramms mit dem 4., 5. und 8. Fließmittel (s. u.) waren die Substanzen T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> auch ohne Nachweis für ca. 1/2 Stunde als dunkle Flecken auf der getrockneten Dünnschicht sichtbar, nicht jedoch Jodid (Abb. 3a)

Rf-Werte (Retension factor) - ausgewertet. Aufgeführt werden hier die mit 100 multiplizierten Rf-Werte (hRf). Gemessen wurde immer vom Auftragspunkt der Substanz bis zum Mittelpunkt des nachgewiesenen Fleckes. Da die Größe des Fleckes von der Menge der aufgetragenen Substanz abhängt, wurden möglichst geringe Konzentrationen auf die Platten pipettiert. Erst wenn scharf voneinander abgegrenzte Flecke auftraten, konnte eine Trennung der Substanzen als gewährleistet betrachtet werden.

#### g) Laufmittel

Die Laufgeschwindigkeit und die Trennung der Substanzen wird neben dem verwendeten Sorptionsmittel von dem Laufmittel bestimmt. Zum Entwickeln des Chromatogramms wählt man ein Laufmittel, dessen Aktivität mit der der Substanz um das Adsorbens konkurriert. Ist die Aktivität des Solvens wesentlich stärker als die der Substanz, so wandert diese an der Fließmittelfront, ist dagegen die der Substanz wesentlich stärker, gelingt es nicht, den Stoff zu eluieren.

Die Fließmittel lassen sich nach ihrer eluierenden Wirkung zur sog. eluotropen Reihe ordnen (37). Zwischen Polarität und Elutionswirkung besteht ein enger Zusammenhang. Als Anhaltspunkt der Polarität kann die Dielektrizitätskonstante dienen. Die organischen Lösungsmittel sind wenig polar (Dielektrizitätskonstante für Dioxan 2, für Essigsäure 6, Butanol 17, Äthylmethyleketon 18, Äthanol 24, . . . Methanol 33,6). Die anorganischen Lösungsmittel sind dagegen stark polar (Wasser hat eine Dielektrizitätskonstante von 80). Zur Trennung eines hydrophilen Stoffgemisches wird ein polares, zur Trennung eines lipophilen Stoffgemisches ein nicht polares Fließmittel benötigt (37).

Während die Substanzen  $T_3$  und  $T_4$  kaum wasserlöslich sind (Löslichkeit ca. 1 mg  $T_3$  bzw. 10 mg  $T_4$  in 1000 ml Wasser), viel besser dagegen in organischen Lösungsmitteln, hauptsächlich Methanol und Butanol gelöst werden, ist Kaliumjodid sehr hydrophil (127,5 g KJ in 100 ml kaltem Wasser). Es wurden deshalb zur chromatographischen Entwicklung mehrkomponentige Fließmittel verwendet. Diese wurden in Anlehnung an die Literatur (40-45) kombiniert aus organischen Lösungsmitteln (hauptsächlich Butanol) und Wasser als anorganischen Anteil. Als Lösungsvermittler dienten Ammoniak und Eisessig.

#### h) Fehlerquellen

Die Größe der  $R_f$ -Werte wird von etlichen Faktoren beeinflusst:

aa) Menge der aufgetragenen Substanz: Je größere Substanzmengen verwendet werden, desto größere Flecken der betreffenden Stoffe treten auf, da sich kein echtes Adsorptions- bzw. Verteilungsgleichgewicht einstellen kann.

bb) Laufgeschwindigkeit:

1. Temperaturänderungen bewirken eine Änderung der Laufgeschwindigkeit. Aus kürzerer Chromatographiedauer resultieren gewöhnlich schlechtere Trennungen und diffusere Fleckverteilung.
2. Mit zunehmender Länge des Chromatogramms nimmt die Aufsteiggeschwindigkeit des Fließmittels und damit der Substanzen ab.
3. Infolge der manuellen Beschichtung der Platten unterliegt die Dünnschicht gewissen Schwankungen an Gleichförmigkeit und Schichtdicke.
4. Auch der Trocknungsgrad der Schicht war nicht immer konstant zu halten.

cc) Kammersättigung: Ist die Kammersättigung nicht optimal, tritt das Randphänomen auf, die Substanzen wandern am Rand schneller als in der Mitte.

Aus diesen Gründen dürfen die Rf-Werte nicht als absolute Größen betrachtet werden, sondern vielmehr als Verhältnismaß der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der verschiedenen Substanzen.

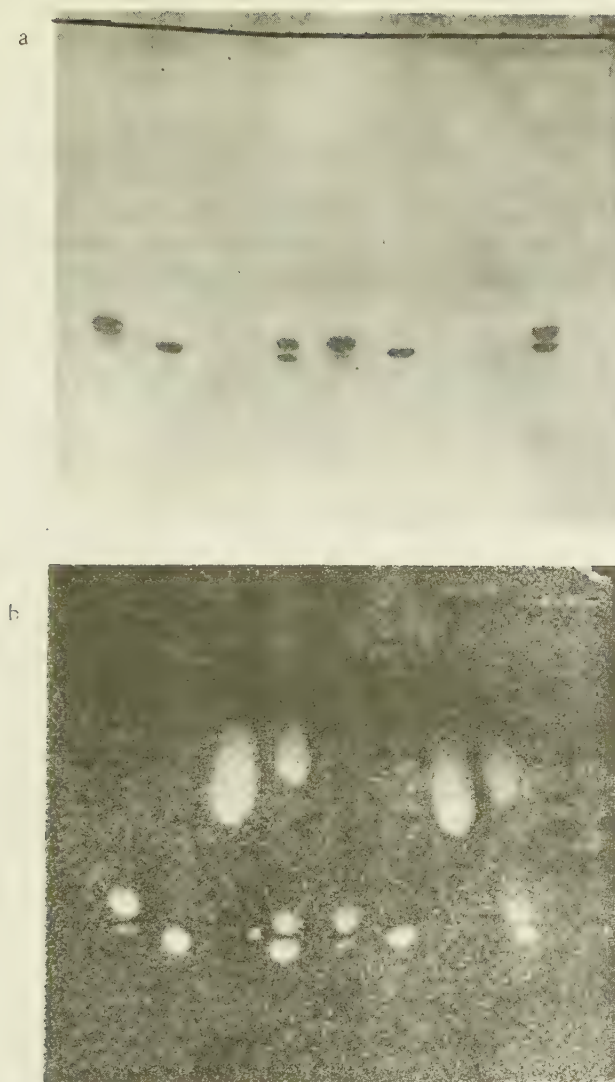
i) hRf-Werte von T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> und KJ

| Laufmittel           | Substanz         | hRf  |        | n  | Bemerkungen                                                                              |
|----------------------|------------------|------|--------|----|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1) Äthylmethylketon: | T <sub>3</sub> ) | 82   | -      | 6  | Laufzeit ca. 15 cm/<br>2 Stdn.                                                           |
|                      | )                |      |        |    |                                                                                          |
| Eisessig             | T <sub>4</sub> ) |      |        | 6  | allen Substanzen                                                                         |
| Wasser 7:3:3         | KJ)              |      |        | 6  | Keine Trennung!                                                                          |
| 2) Methanol:         | T <sub>3</sub>   | 72,7 | + 2,59 | 6  | Laufzeit ca. 17 cm/<br>90 Min.                                                           |
| 0,5 N Essig-säure    | T <sub>4</sub>   | 46,7 | + 0,94 | 6  | Schwanzbildung bei<br>allen Substanzen von<br>Auftragstelle bis Front<br>der Substanzen. |
| a) 2:8               | KJ               | 100  | -      | 4  |                                                                                          |
| b) 1:2               | T <sub>3</sub>   | 73   | -      | 6  | Damit chemisch keine<br>Trennung, radioaktiv<br>dagegen Trennung<br>teilweise möglich!   |
|                      | T <sub>4</sub>   | 73   | -      | 6  |                                                                                          |
|                      | KJ               | 89   | -      | 4  |                                                                                          |
| c) 8:2               | T <sub>3</sub>   | 70   | + 1,51 | 7  |                                                                                          |
|                      | T <sub>4</sub>   | 80,3 | + 1,66 | 7  |                                                                                          |
|                      | KJ               | 80,4 | + 0,9  | 7  |                                                                                          |
| 3) N-Butanol:        | T <sub>3</sub>   | 53,2 | + 3,52 | 5  | T <sub>3</sub> und T <sub>4</sub> nicht in 2                                             |
| Methanol:            | T <sub>4</sub>   | 49   | + 1,1  | 5  | deutlich abgegrenzte                                                                     |
| 2 N NH <sub>3</sub>  | KJ               | 61,4 | + 2,2  | 10 | Flecke getrennt, aber                                                                    |
| 6:2:2                |                  |      |        |    | gute Abgrenzung von<br>KJ! Laufzeit ca. 17cm/<br>3 Stdn.                                 |

| Laufmittel         | Substanz       | hRf  | n          | Bemerkungen |                                                                          |
|--------------------|----------------|------|------------|-------------|--------------------------------------------------------------------------|
| 4) N-Butanol:      | T <sub>3</sub> | 42,4 | $\pm 3,2$  | 15          | Alle 3 Substanzen<br>sind in 3 sehr gut<br>voneinander abge-<br>grenzten |
| Äthanol:           | T <sub>4</sub> | 35,7 | $\pm 3,2$  | 24          |                                                                          |
| 2N NH <sub>3</sub> | KJ             | 57,8 | $\pm 3,3$  | 19          |                                                                          |
| a) 5:1:2           |                |      |            |             | Flecken getrennt!<br>Laufzeit ca.<br>16 cm/3 Stdn.                       |
| b) 7:1:2           | T <sub>3</sub> | 39,1 | $\pm 2,1$  | 12          |                                                                          |
|                    | T <sub>4</sub> | 33,6 | $\pm 1,8$  | 16          |                                                                          |
|                    | KJ             | 59,3 | $\pm 2,58$ | 12          |                                                                          |
| 5) N-Butanol:      | T <sub>3</sub> | 45,6 | $\pm 2,45$ | 25          |                                                                          |
| Dioxan:            | T <sub>4</sub> | 39,5 | $\pm 2,52$ | 23          |                                                                          |
| 2N NH <sub>3</sub> | KJ             | 52,4 | $\pm 3,2$  | 18          |                                                                          |
| a) 4:1:5           |                |      |            |             | Sehr gute Trennung                                                       |
| b) 4:1:4           | T <sub>3</sub> | 41,7 | $\pm 2,4$  | 9           |                                                                          |
|                    | T <sub>4</sub> | 35,5 | $\pm 2,52$ | 13          |                                                                          |
|                    | KJ             | 45   | $\pm 2,51$ | 5           | in 3 scharf abge-                                                        |
| c) 5:1:4           | T <sub>3</sub> | 44,1 | $\pm 2,5$  | 10          |                                                                          |
|                    | T <sub>4</sub> | 38,7 | $\pm 2,58$ | 16          |                                                                          |
|                    | KJ             | 53,6 | $\pm 3,5$  | 11          |                                                                          |
| d) 5:1:3           | T <sub>3</sub> | 39,8 | $\pm 2,36$ | 11          |                                                                          |
|                    | T <sub>4</sub> | 35,6 | $\pm 1,44$ | 13          |                                                                          |
|                    | KJ             | 51,8 | $\pm 2,42$ | 12          |                                                                          |
| e) 5:1:2           | T <sub>3</sub> | 39   | -          | 1           | Laufzeit ca.<br>16 cm/3 Stdn.                                            |
|                    | T <sub>4</sub> | 34   | -          | 1           |                                                                          |
|                    | KJ             | 49   | -          | 1           |                                                                          |
| 6) N-Butanol       | T <sub>3</sub> | 70,9 | $\pm 3,1$  | 9           | Keine Trennung<br>von T <sub>3</sub> und T <sub>4</sub> !                |
| Eisessig:          | T <sub>4</sub> | 69,3 | $\pm 3,3$  | 9           |                                                                          |
| Wasser             | KJ             | 64,2 | $\pm 1,08$ | 4           |                                                                          |
| a) 8:2:2           |                |      |            |             |                                                                          |

| Laufmittel         | Substanz       | hRf  |            | n  | Bemerkungen                           |
|--------------------|----------------|------|------------|----|---------------------------------------|
| b) 8:3:3           | T <sub>3</sub> | 69   | -          | 1  |                                       |
|                    | T <sub>4</sub> | 67   | -          | 1  | KJ jedoch ist gut                     |
|                    | KJ             | 50   | -          | 1  |                                       |
| c) 8:3:1           | T <sub>3</sub> | 60,7 | $\pm 1,24$ | 6  | von T <sub>3</sub> und T <sub>4</sub> |
|                    | T <sub>4</sub> | 60,5 | $\pm 2,2$  | 6  | abzugrenzen.                          |
|                    | KJ             | 49,6 | $\pm 1,4$  | 8  |                                       |
| d) 6:3:1           | T <sub>3</sub> | 65,8 | $\pm 0,98$ | 5  | Laufzeit ca.                          |
|                    | T <sub>4</sub> | 65,8 | $\pm 0,98$ | 5  |                                       |
|                    | KJ             | 58,2 | $\pm 0,75$ | 5  | 17 cm/3 Stdn.                         |
| 7) sek. Butanol:   | T <sub>3</sub> | 43,4 | $\pm 1,05$ | 7  | Laufzeit ca. 18 cm/                   |
| 2N NH <sub>3</sub> | T <sub>4</sub> | 37,3 | $\pm 1,09$ | 8  | 4 Stdn. T <sub>3</sub> und KJ         |
| 6:4                | KJ             | 40,7 | $\pm 1,27$ | 6  | nicht in 2 klar ab-                   |
|                    |                |      |            |    | grenzbare Flecke ge-                  |
|                    |                |      |            |    | trennt. Doch Trennung                 |
|                    |                |      |            |    | dieser beiden Sub-                    |
|                    |                |      |            |    | stanzen von T <sub>4</sub> mög-       |
|                    |                |      |            |    | lich!                                 |
| 8) N-Butanol:      | T <sub>3</sub> | 34,5 | $\pm 2,24$ | 26 | Laufzeit ca. 18 cm/                   |
| Äthylmethyl-       | T <sub>4</sub> | 29,7 | $\pm 2,2$  | 30 | 3 Stdn. Sehr gute                     |
| keton:             |                |      |            |    | Trennung der 3 Sub-                   |
| 2N NH <sub>3</sub> | KJ             | 61,3 | $\pm 3,85$ | 28 | stanzen in 3 deutlich                 |
| a) 5:1:2           |                |      |            |    | voneinander abge-                     |
| b) 5:1:4           | T <sub>3</sub> | 42   | -          | 1  | grenzte Flecken!                      |
|                    | T <sub>4</sub> | 37   | -          | 2  | (Abb. 3)                              |
|                    | KJ             | 49   | -          | 1  |                                       |

Abb. 3



$T_3$   $T_4$   $J^-$   $T_3$   $T_3$   $T_4$   $J^-$   $T_3$   
 $T_4$   $T_4$

Abb. 3: Dünnschichtchromatographische Trennung von T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> und Jodid

Wie unter "METHODEN" beschrieben, wurden je 5 µg der Substanzen T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> und KJ aufgetragen und mit dem 8. Laufmittel (N-Butanol: Äthylmethylketon: 2N NH<sub>3</sub> 5:1:2) entwickelt. Wie im Text ausgeführt, waren T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> ohne Nachweis als dunkle Flecken an derselben Stelle sichtbar (a)) wie im nachgewiesenen Chromatogramm (b)).

k) Trennung von  $T_3$ ,  $T_4$  und KJ

Aus der Tabelle der Ergebnisse (hRf-Werte) kann man ersehen, daß es mit Hilfe der 3 Fließmittel

N-Butanol; Äthanol;  $2N\ NH_3$  (4. Fließmittel)

N-Butanol; Dioxan ;  $2N\ NH_3$  (5. Fließmittel)

N-Butanol; Äthylmethylketon;  $2N\ NH_3$  (8. Fließmittel)

möglich ist, die Substanzen  $T_3$ ,  $T_4$  und KJ aus einem Gemisch chromatographisch zu trennen (Abb. 3).

Eine Abgrenzung des KJ von den beiden Substanzen  $T_3$  und  $T_4$  gelingt auch mit dem 3. Laufmittel (N-Butanol; Methanol;  $2N\ NH_3$ ) und dem 6. Laufmittel (N-Butanol; Eisessig; Wasser)

$T_4$  wiederum kann von  $T_3$  und KJ auch mit dem 7. Laufmittel (sekundäres Butanol;  $2N\ NH_3$ ) getrennt werden.

l) Nachweisgrenzen der einzelnen Substanzen

Trägt man die einzelnen Substanzen in einer Verdünnungsreihe fallender Konzentrationen auf die Dünnschicht auf, ohne diese zu entwickeln, so ergibt sich für KJ eine untere Nachweisgrenze von 2,5  $\gamma$  mit dem Palladiumchloridnachweis und 0,25  $\gamma$  mit der Cer-Arsenit-Reaktion.

Die Nachweisgrenze von  $T_3$  und  $T_4$  läßt sich im nicht entwickelten Chromatogramm nicht bestimmen, da auch NaOH, deren Lösungsmittel Cer-Arsenit an der Auftragsstelle entfärbt. Nach Entwicklung des Chromatogramms fällt diese Schwierigkeit fort, da NaOH mit den hier gewählten Laufmitteln nicht wandert und an der Auftragsstelle liegen bleibt. In diesem Fall ergibt sich eine untere Nachweisgrenze der einzelnen Substanzen von 0,5  $\gamma$ .

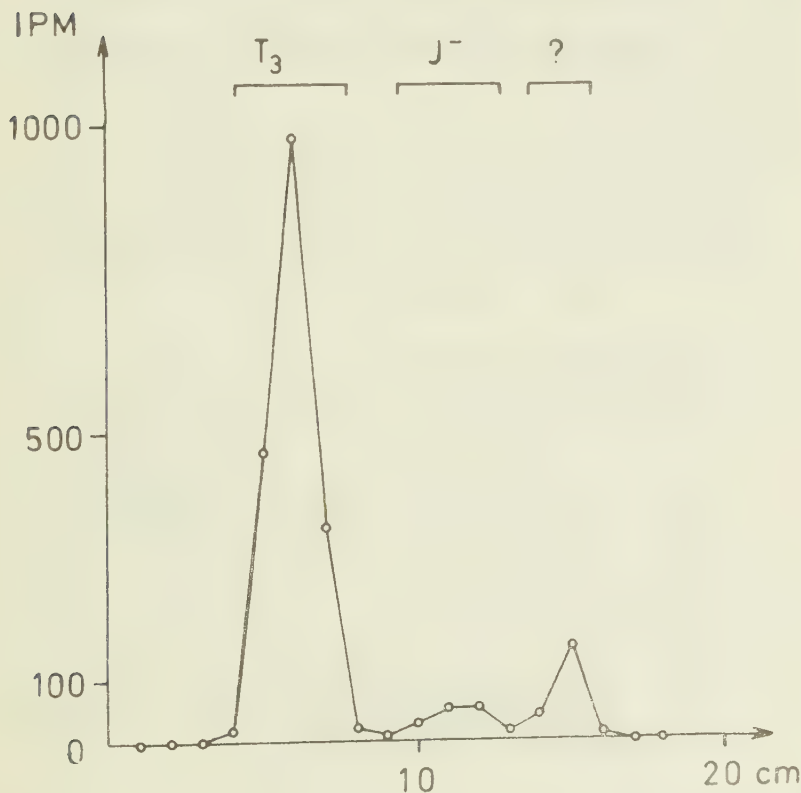
#### m) Reinheit der Substanzen

1. L-Trijodthyronin-<sup>127</sup> Jod: Bei der Chromatographie von  $T_3$ -127 in fallenden Konzentrationen war bei einer aufgetragenen Menge von  $6 \mu g$   $T_3$  noch deutlich eine Verunreinigung mit dem Rf-Wert des  $T_4$  zu erkennen. Auf Grund der unteren Nachweisgrenze von  $T_4$  (s. o.) konnten wir deshalb auf einen Thyroxingehalt des Trijodthronins von ca. 4 % schließen.
2. L-Trijodthyronin-<sup>125</sup> Jod: Nach der unter e) beschriebenen Methode ließen sich chromatographisch die Verunreinigungen des  $T_3$ -125 bestimmen. Es interessierte hier vor allem der Jodidgehalt. Je nach aufgetragenen Mengen ergaben sich sehr verschiedene Werte. Der Grund hierfür liegt in der Schwierigkeit, daß relativ große Volumina des  $T_3$ -125 aufgetragen werden müssen, damit für jeden Gipfel eine genügend hohe Impulszahl erzielt wird - der statistische Fehler soll möglichst klein gehalten werden - die Trennung der einzelnen Substanzen jedoch mit zunehmender aufgetragener Substanzmenge, wie unter h) beschrieben, schlechter wird. Dadurch wird die ohnedies nicht optimale Auswertung des Chromatogramms (s. unter e)) noch schwieriger, indem kein ausreichend aktivitätsarmes Intervall zwischen den einzelnen Gipfeln mehr erzielt wird - ein Gerät zur Auszählung des Radiodünnschichtchromatogramms nach dem Prinzip des "Scannings" stand uns nicht zur Verfügung. Aus diesem Grunde war ein  $T_4$ -Gipfel radiodünnschichtchromatographisch nicht abgrenzbar. So lag der berechnete Jodidgehalt bei einer aufgetragenen  $T_3$ -125-Menge von 0,02 ml beim 2. Fließmittel (Methanol: Essigsäure 8:2) wegen der erheblichen "Schwanzbildung" mit 15 % extrem hoch, während sich beim 6. Laufmittel (N-Butanol: Eisessig: Wasser 8:3:1) ein Wert von ca. 10 % ergab. Beim 8. Laufmittel (N-Butanol: Äthylmethylketon: 2 N  $NH_3$  5:1:2) lag der Jodidanteil des  $T_3$ -125 bei einer aufgetragenen Menge von 0,01 ml um 6 %, bei 0,005 ml um 3,4 %. Mit zunehmendem Alter des  $T_3$ -125-Standards

vergrößerte sich der Anteil eines weiteren Stoffes (wahrscheinlich ein Jod-Tyrosin), der bei der vier Monate alten Lösung bei Chromatographie mit dem 8. Fließmittel (Abb. 4) ca. 9 % ausmachte. Über die Wichtigkeit der laufenden Überprüfung der Reinheit des  $T_3$ -125 s. u. Papierchromatographie g).

Abb. 4: Dünnschichtchromatographische Bestimmung des Gehalts an Verunreinigungen des vier Monate alten  $T_3$ -125-Arbeitsstandards.

Wie unter "METHODEN" beschrieben, wurden  $5 \mu\text{l}$   $T_3$ -125 = ca.  $0,001 \mu\text{Ci}$  aufgetragen, mit dem 8. Laufmittel (N-Butanol:Äthylmethylketon:2N  $\text{NH}_3$  5:1:2) entwickelt und ausgezählt

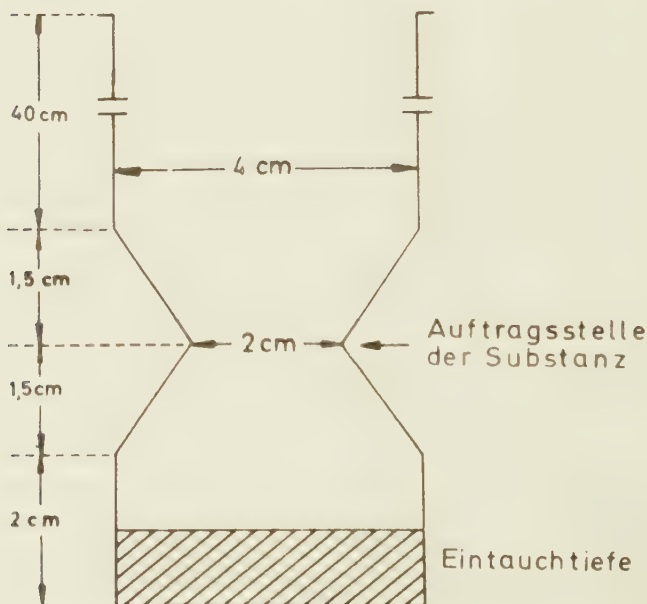


## 2. METHODE der Papierchromatographie

### a) Stabile Phase

Als stabile Phase wurde Filterpapier der Fa. Schleicher und Schüll Nr. 2043 bMgl. verwendet. In Vorversuchen wurden Streifen verschiedener Breite und Formgebung an dem Ende, das in das Fließmittel eintauchen sollte, getestet. Mit der von uns gewählten Breite (4 cm) und Formgebung (Abb. 5) konnten gute Laufgeschwindigkeit und Wandern der Substanzen in geraden Banden erzielt werden. Die Länge des Streifens betrug der Entwicklungskammer entsprechend ca. 45 cm.

Abb. 5: Schematische Darstellung der Formgebung des Filterpapierstreifens



## b) Aufgetragene Proben

Es wurden jeweils 10 µl der Lösungen, was einer Menge von je 10 µg  $T_3$ ,  $T_4$  (beides in 0,1 N-NaOH gelöst) und KJ (in Aqua bidest. gelöst) entsprach, einzeln und als Gemisch dieser drei Substanzen aufgetragen. Zur Trennung der Verunreinigungen des  $T_3$ -125 wurden je nach Alter des Standards 10 bis 20 µl aufgetragen, so daß für jeden Gipfel eine genügend hohe Impulszahl erzielt werden konnte

## c) Entwicklung des Chromatogramms

Nach vollständigem Abdampfen der Lösungsmittel wurden die Streifen für ca. 2 Stunden in die mit Fließmittel gesättigte Kammer (kräftiges Schütteln des vollständig mit Filterpapier ausgekleideten, 200 ml Fließmittel enthaltenden Behälters 20 x 15 x 55 cm) gehängt, ohne in die mobile Phase einzutauchen. Anschließend wurde das Chromatogramm in auf- oder absteigender Weise entwickelt, wobei sich die mobile Phase wie üblich in Extra-Behältern befand. Besonders war auf ein luftdichtes Verschließen der Kammer mit einem plangeschliffenen Deckel, der zusätzlich mit einem Gewicht beschwert wurde, zu achten.

- d) Nachweis der Substanzen, Zählen der Radioaktivität (Schneiden des Filterpapiers in 1 cm Breite), Berechnung der Rf-Werte und Wahl der Fließmittel erfolgte wie bei der Dünnschichtchromatographie beschrieben.

## e) hRf-Werte von Trijodthyronin, Thyroxin und Jodid

| Laufmittel           | Art der Chromatographie | Substanz       | hRf         | n  | Bemerkungen               |
|----------------------|-------------------------|----------------|-------------|----|---------------------------|
| 1) Äthylmethylketon: | aufsteigend             | T <sub>3</sub> | 85,3 + 2,12 | 22 | Laufzeit ca. 40 cm/20Std. |
| Eisessig:            |                         | T <sub>4</sub> | 85,3 + 2,12 | 22 |                           |
| Wasser:              |                         | KJ             | 42,7 + 1,38 | 13 |                           |
| 7:3:3                |                         |                |             |    |                           |

| Laufmittel                                  | Art der Chromatogr. | Substanz       | hRf         | n  | Bemerkungen  |
|---------------------------------------------|---------------------|----------------|-------------|----|--------------|
| 2) Methanol:<br>0,5N-Essig-<br>säure<br>2:8 | aufsteigend         | T <sub>3</sub> | 30,1 + 0,77 | 8  | Laufzeit     |
|                                             |                     | T <sub>4</sub> | 16,8 + 1,34 | 6  | ca. 44 cm/   |
|                                             |                     | KJ             | 70,4 + 1,2  | 10 | 14 Stdn.     |
| 5) N-Butanol:                               |                     | T <sub>3</sub> | 78,3 + 3,1  | 6  | Laufzeit ca. |
| Dioxan:                                     | aufsteigend         | T <sub>4</sub> | 72,3 + 1,92 | 4  | 25 cm/       |
| 2N NH <sub>3</sub><br>4:1:5                 |                     | KJ             | 42,9 + 3,68 | 7  | 20 Stdn.     |
| 5) N-Butanol:                               |                     | T <sub>3</sub> | 76,1 + 3,14 | 7  | Laufzeit ca. |
| Dioxan:                                     | absteigend          | T <sub>4</sub> | 67,6 + 1,62 | 5  | 30 cm/       |
| 2N NH <sub>3</sub><br>4:1:4                 |                     | KJ             | 44 + 1,3    | 7  | 20 Stdn.     |
| 7) sek. Butanol:                            |                     | T <sub>3</sub> | 71,3 + 2,51 | 3  | Laufzeit ca. |
| 2N NH <sub>3</sub>                          | aufsteigend         | T <sub>4</sub> | 62,7 + 2,08 | 3  | 35 cm/       |
| 6:4                                         |                     | KJ             | 42 + 2      | 3  | 48 Stdn.     |

#### f) Trennung von Trijodthyronin, Thyroxin und Jodid

Mit allen vier aufgeführten Fließmitteln ließ sich aus einem Gemisch das Jodid von den beiden Substanzen T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> deutlich abgrenzen. T<sub>4</sub> konnte von T<sub>3</sub> jedoch nur mit dem 5. Fließmittel (N-Butanol; Dioxan; 2 N NH<sub>3</sub>) getrennt werden, und zwar am besten in absteigender Chromatographie. Aber auch hier gelang es nicht, eine völlig für Cer-Arsenit reaktionslose Zone zwischen T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> zu erreichen.

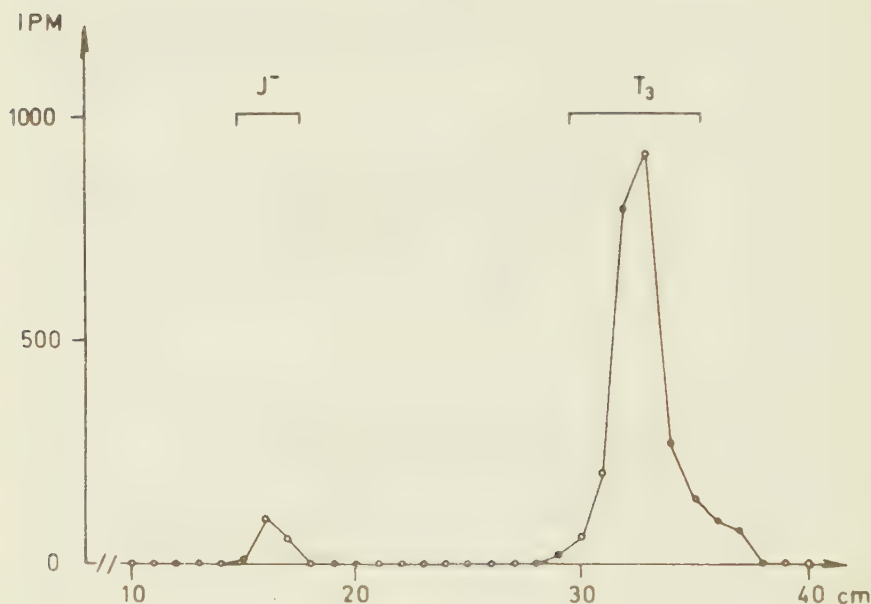
g) Reinheit der Substanzen

1. L-Trijodthyronin-<sup>127</sup>Jod: Wegen der unzureichenden Trennung von  $T_3$  und  $T_4$  war die Papierchromatographie nicht besonders geeignet, einen  $T_4$ -Anteil des  $T_3$  zu bestimmen.
2. L-Trijodthyronin-<sup>125</sup>Jod: Der Jodidgehalt des  $T_3$ -125 betrug bei der Bestimmung des zwei Monate alten Arbeitsstandards mit dem 2. Laufmittel (Methanol; Essigsäure) ca. 3,5 %. Bei der drei Monate alten Lösung machte der Jodidanteil bei den vier verschiedenen Fließmitteln jeweils ca. 5,5 % aus (Abb. 6).

Abb. 6: Bestimmung des Jodid-Anteils des L-Trijodthyronin-<sup>125</sup>Jods mittels aufsteigender Papierchromatographie

Wie unter "METHODEN" angegeben, wurden 20  $\mu$ l des drei Monate alten  $T_3$ -125 = ca. 0,008  $\mu$ Ci aufgetragen und mit dem 1. Laufmittel (Äthylmethyleketon; Eisessig; Wasser 7:3:3) entwickelt. Auf Grund des gleichen  $R_{F}$ -Wertes (s. unter e)) liegt  $T_4$  im  $T_3$ -Gipfel.

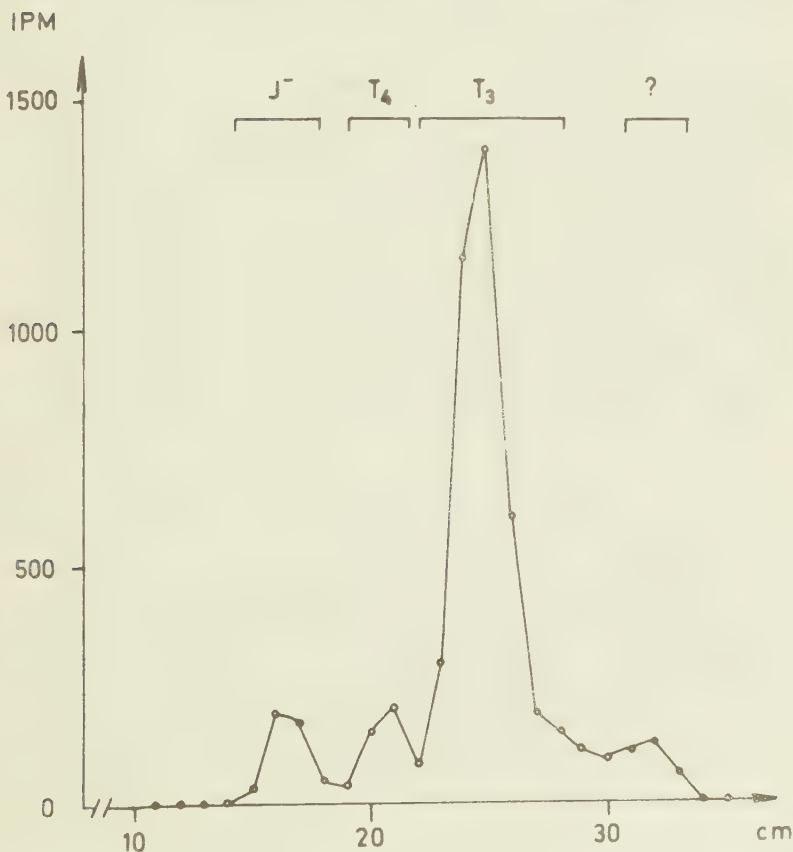
Abb. 6



Bei der absteigenden Chromatographie mit dem 5. Laufmittel (N-Butanol; Dioxan; 2N  $\text{NH}_3$ ) konnten noch zwei Gipfel ( $T_4$  und ein anderer Stoff - wahrscheinlich ein Jod-Tyrosin) deutlich, wenn auch durch keinen aktivitätsfreien Intervall getrennt, abgegrenzt werden (Abb. 7). Der Anteil des Jod Tyrosins (?) stieg mit zunehmendem Alter des  $T_3$ -125 an.

Abb. 7: Bestimmung des Anteils der Verunreinigungen des L-Trijod-thyronin-<sup>125</sup>Jods mittels absteigender Papierchromatographie

Auftragen der 20  $\mu$ l des vier Monate alten  $T_3$ -<sup>125</sup>-Arbeits-standards, absteigende Entwicklung mit dem 5. Laufmittel (N-Butanol-Dioxan-2N  $NH_3$ ) und Auswertung des Chromatogramms wie unter "METHODEN" beschrieben.



Mit der Möglichkeit der papier- sowie dünnschichtchromatographischen (s. o.) Trennung von Jodid und Schilddrüsenhormonen hatten wir eine nützliche Methode zur Hand, um unsere radioaktiv markierten L-Tri-jodthyroninlösungen ( $T_3$ -125) laufend auf ihre Verunreinigungen prüfen zu können. Dies erwies sich von großer Wichtigkeit, da es vorkam, daß jene Lösungen keine ausreichende Reinheit, die zur Reproduzierbarkeit der Werte erforderlich ist, zeigten.

## V. DEXTRAN GEL FILTRATION MITTELS DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Wegen der erheblichen Vorteile, die die Dünnschichtchromatographie gegenüber den anderen üblichen chromatographischen Trennungsmethoden bietet, wie oben bereits aufgezeigt wurde, versuchten wir die Dextrangelfiltration von der Säule auf Dünnschicht zu übertragen.

Dazu wurde, wie unter Methoden der Dünnschichtchromatographie beschrieben, ca. zwei Stunden gequollenes Sephadex G 25 superfine in 0,5 bis 0,9 mm Schichtdicke auf die Platten aufgetragen. Nach leichtem Antrocknen der Schicht an der Luft wurden je 0,01 ml einer "kalten"  $\Gamma_3$ -,  $T_4$ - und Kaliumjodid-Lösung, mit einer Substanzmenge von je 20  $\mu$ g, aufgetragen. Weiter wurden nebeneinander 0,05 ml eines Inkubationsgemisches aus 0,05 ml  $T_3$ -125-Lösung (s. o.) mit 0,5 ml Serum, ferner 0,05 ml Serum und schließlich zur Markierung der Fließmittelfront 0,01 ml einer Hämoglobininlösung bzw. einer 0,2%igen Blue-Dextran 2000-Lösung (Fa. Pharmacia, Uppsala) aufgetragen. Die Auftragstellen waren 1,5 cm vom unteren Plattenrand entfernt, der gegenseitige Abstand betrug 3 cm.

Nach Auftragen der Substanzen wurden die Platten in absteigender Weise entwickelt, wobei das Fließmittel (0,01 M Natriumphosphatpuffer  $p_H$  7,4) mittels eines Filterpapierstreifens aus einem Puffervorratstrog auf die Platten geleitet wurden. Der Neigungswinkel gegen die Ebene der Platten betrug ca.  $30^\circ$ , woraus eine Laufgeschwindigkeit des Fließmittels von ca. 3 cm pro Stunde resultierte. Nach Beendigung der Chromatographie wurden die Platten vorsichtig an der Luft getrocknet und daran anschließend die einzelnen Substanzen durch Besprühen der Gelschicht mit geeigneten Reagenzien nachgewiesen.

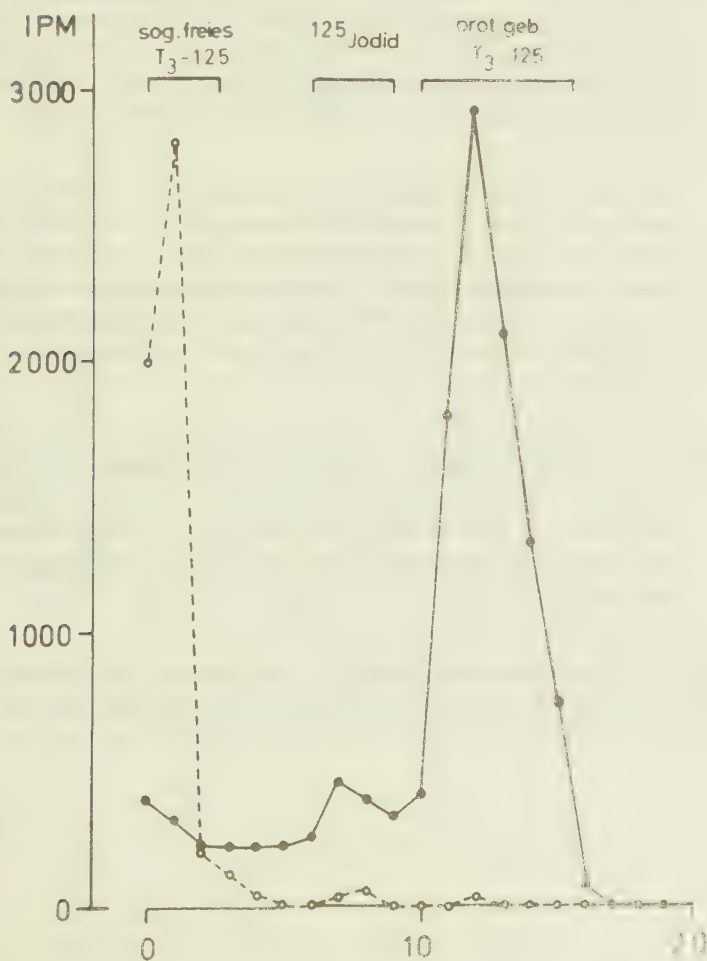
Zum Nachweis von  $T_3$ ,  $T_4$  und Jodid bedienten wir uns der oben angegebenen Cer-Arsenit-Reaktion bzw. des Palladiumchlorids in Aceton plus wenigen Tropfen rauchender Salzsäure (38). Zum Protein-nachweis verwendeten wir eine 0,5%ige Echtblausalz-B-Lösung mit nachfolgendem Besprühen des Chromatogramms mit 0,1 normaler Natronlauge (38).

Zur Auszählung des radioaktiven Streifens wurde dieser in 1 cm breiten Fraktionen von der Platte abgekratzt und im automatischen Probenwechsler der Deutschen Picker-GmbH gezählt.

Aus einem Gemisch von "kaltem"  $T_3$  und  $T_4$ , Jodid und Serum erhielten wir drei getrennte Flecken beim chemischen Nachweis; sog. freies  $T_3$  und  $T_4$  blieben nahe der Auftragsstelle, am weitesten wanderte das proteingebundene Hormon, und das Jodid lag zwischen beiden.

Beim Auszählen des Chromatogramms mit dem aufgetragenen Inkubationsgemisch aus Serum und  $T_3$ -125 fanden wir ebenfalls drei Gipfel, die allerdings durch kein auch nur annähernd aktivitätsfreies Intervall getrennt waren (Abb. 8).

Abb. 8: Dextrangelfiltration von L-Trijodthyronin-<sup>125</sup>Jod mit und ohne Inkubation mit Serum mittels absteigender Dünnschichtchromatographie. Beschichten der Platten mit Sephadex G 25 superfine, Auftragen von 15  $\mu$ l T<sub>3</sub>-125-Arbeitsstandard (o ---- o) bzw. 40  $\mu$ l Inkubationsgemisches aus T<sub>3</sub>-125 Serum (● — ●), Entwicklung und Auswertung des Chromatogramms wie unter "METHODEN" beschrieben.



Das erschwerte die Auswertung natürlich ganz erheblich.

Die Schwierigkeiten der radiodünnschichtchromatographischen Trennung der Anteile des  $T_3$ -125 liegen im wesentlichen an drei Faktoren:

1. Es müssen relativ sehr große Volumina des Inkubationsgemisches aufgetragen werden, damit für jeden Gipfel eine genügend hohe Impulszahl erzielt wird - der statistische Fehler soll möglichst klein gehalten werden. Dadurch erhält man zu große Flecken und unterschiedlich breite Banden auf dem Dextrangel, so daß das Inkubationsgemisch verschieden große Sephadexmengen passiert (s. u.).
2. Das Abkratzen der Gelschicht ist zwangsläufig mit Verlusten verbunden; auch ein Aufbringen des Dextrangels auf eine sich chemisch indifferent verhaltende Kunststoffolie hat sich nicht bewährt, da beim Zerschneiden ebenfalls Verluste sich nicht vermeiden lassen. Ein Gerät, mit dem die Platten nach dem Prinzip des "Scannings" ausgewertet werden können, stand uns nicht zur Verfügung.
3. Wie in der "EINLEITUNG" ausgeführt, kompetiert das Dextrangel mit den Serumproteinen um das reversibel gebundene Trijodthyronin, so daß eine  $T_3$ - "Schwanzbildung" resultiert. Diese ist abhängig von der "Dicke der Dünnschicht", die nicht sicher ganz gleichmäßig herzustellen ist und von der Menge des passierten Dextrangels (s. o.) verschieden groß ist.

So waren wir schließlich gezwungen, die Versuche, die Technik auf diesem zunächst vielversprechenden Wege zu vereinfachen, abzubauen.

## VI. DEXTRANGELFILTRATION MIT SEPHADEX $G_{10}$ -

Die Verwendung des Sephadex  $G_{10}$  für die Trennung des proteingebundenen und sog. freien Anteils an  $T_3$ -125 im Serum ließ auf Grund der stärkeren Vernetzung erhebliche Vorteile gegenüber dem bisher gebräuchlichen Sephadex  $G_{25}$  fine vermuten. So konnten auch unter denselben Bedingungen wie unter "METHODEN" beschrieben (2 g Sephadex) bessere Trennungen des I. und II. Gipfels, also des proteingebundenen Anteils an  $T_3$  und des Jodidgehalts des Reagenz, erzielt werden. Von besonderem Vorteil erwies sich die Tropfgeschwindigkeit der Sephadex  $G_{10}$ -Säule, die mit durchschnittlich 27 Tropfen pro Minute fast doppelt so schnell lief wie die bei Verwendung von Sephadex  $G_{25}$  fine.

Es ergab sich jedoch die Schwierigkeit, das sog. freie  $T_3$ -125 aus der Säule vollständig zu entfernen. So war es mit zweimaligem Nachwaschen mit je 2 ml Normalserum oder mit dreimaligem Nachwaschen mit je 1 ml 0,1 N NaOH nicht möglich, mehr als 80 % der aufgetragenen Aktivität wiederzugewinnen. Die Werte des proteingebundenen  $T_3$ -125, die bei der Gelfiltration mit Sephadex  $G_{25}$  fine analog zu den Ergebnissen des RBC-Uptake-Tests im Bereich von 82 - 88 % lagen, bewegten sich bei Verwendung von  $G_{10}$  größenordnungsmäßig um 60 %, bei der doppelten Gelmenge (4 g Sephadex  $G_{10}$ ) um 45 %.

Da es also nicht gelang, das dextrangelgebundene  $T_3$ -125 ohne großen Aufwand oder grobe Veränderung der physiologischen Verhältnisse (z. B. starke  $p_H$ -Wert-Verschiebung durch Nachwaschen der Säulen mit stärkerer NaOH) vollständig von der Säule zu entfernen und dadurch die festere Adsorption des  $T_3$ -125 an das stark vernetzte Sephadex  $G_{10}$  die Serumprotein-Bindungsverhältnisse des  $T_3$ , wie sie im RBC-Uptake-Test

bestehen und für physiologisch angesehen werden können (s. "EIN-LEITUNG"), erheblich verändert werden, mußten wir auf die oben beschriebenen Vorteile der Sephadex  $C_{10}$ -Gelfiltration verzichten. Es konnte jedoch mit diesen Versuchen nochmals gezeigt werden, daß das Sephadex nicht nur als ein Molekulsieb wirkt, sondern bei der Gelfiltration von  $T_3$ -125 kompetitiv in die Serumproteinbindungsverhältnisse eingreift.

## VII. BESTIMMUNG DES PROTEINGEBUNDENEN JODS IM SERUM (PB $^{127}\text{I}$ )

Hier kam die Methode nach BARKER (85), modifiziert von SCRIBA, LANDGRAF und Mitarbeitern (10, 14), zur Anwendung. Frau E. Sam-bauer danke ich für die technische Assistenz bei diesem Verfahren.

## VIII KLINISCHE ANWENDUNG DER DEXTRAN GEL FILTRATION

### 1. Untersuchungen über den Schilddrüsenfunktionszustand unter Ovulationshemmer-Therapie

Zur Kontrazeption werden in zunehmendem Maße orale Ovulationshemmer, eine Kombination aus Gestagenen und Oestrogenen, verwendet. Dabei erhebt sich die Frage nach möglichen Nebenwirkungen. Diskutiert wird unter anderem eine diabetogene Wirkung der Antiovlantien (46), ferner wird von einem signifikanten Anstieg des PBI, verminderten RBC-Uptake-Werten, dem Anstieg des Serumcortisolspiegels und von Änderungen der Eiweißbindung der Corticosteroide unter Oestrogenbehandlung berichtet (47-53). Weitere Nebenwirkungen wie gesteigerte Thromboseneigung und medikamentöse Hepatosen sind umstritten (53-60).

Bei der breiten Anwendung der Ovulationshemmer lag so eine Untersuchung der Schilddrüsenfunktion unter Antiovlantientherapie mit den bewährten und spezifischen Methoden nahe

Die Bestimmungen wurden bei acht bzw. zehn freiwilligen Versuchspersonen vor und während der Gabe zweier verschiedener Gestagen-Oestrogen-Präparate vorgenommen.

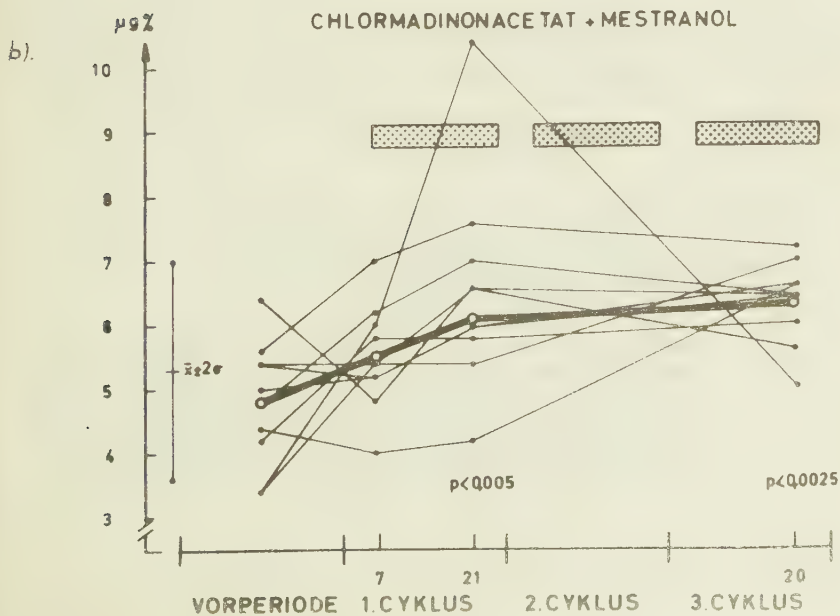
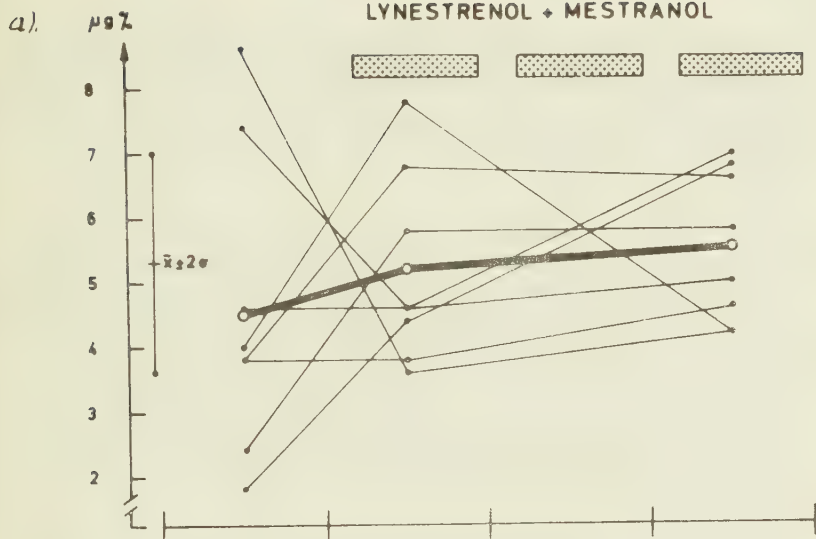
Der ersten Gruppe wurde ein Kombinationspräparat mit 2,5 mg Lynestrenol + 0,075 mg Mestranol (Lyndiol 2,5<sup>R</sup> der Fa. Organon), der zweiten Gruppe ein Kombinationspräparat mit 3,0 mg Chlormadinonacetat + 0,1 mg Mestranol (Aconcen<sup>R</sup> der Fa. Merck AG) verabreicht.

Abb 9: Proteingebundenes Jod (PB<sup>127</sup>I) vor und unter Behandlung

a) mit Lynestrenol + Mestranol

b) mit Chlormadinonacetat + Mestranol

Behandlungsschema und Methodik s. Text. Angeführt sind Einzelwerte (●—●) und Mittelwerte (○—○) des PB<sup>127</sup>I



In der ersten Untersuchungsreihe wurde zu einem beliebigen Zeitpunkt vor und während des ersten und dritten Zyklus unter der Gabe von Lynestrenol + Mestranol das proteingebundene Jod ( $\text{PB}^{127}\text{I}$ ) und der Anteil an proteingebundenem und sog. freien Trijodthyronin im Serum bestimmt.

Bei der zweiten Untersuchungsreihe mit Chlormadinonacetat + Mestranol wurden die Bestimmungen vor Medikation ebenfalls zu einem beliebigen Zeitpunkt des Zyklus durchgeführt, die folgenden am 7. und 21. Tag des ersten Zyklus sowie am 20. Tag des dritten Zyklus.

Wie aus der Abb. 9 zu ersehen, fanden wir einen Anstieg des protein- gebundenen Jods unter Gabe von Ovulationshemmern, der unter Lynestrenol + Mestranol deutlich, unter Chlormadinonacetat + Mestranol signifikant ist ( $p < 0,0025$ ).

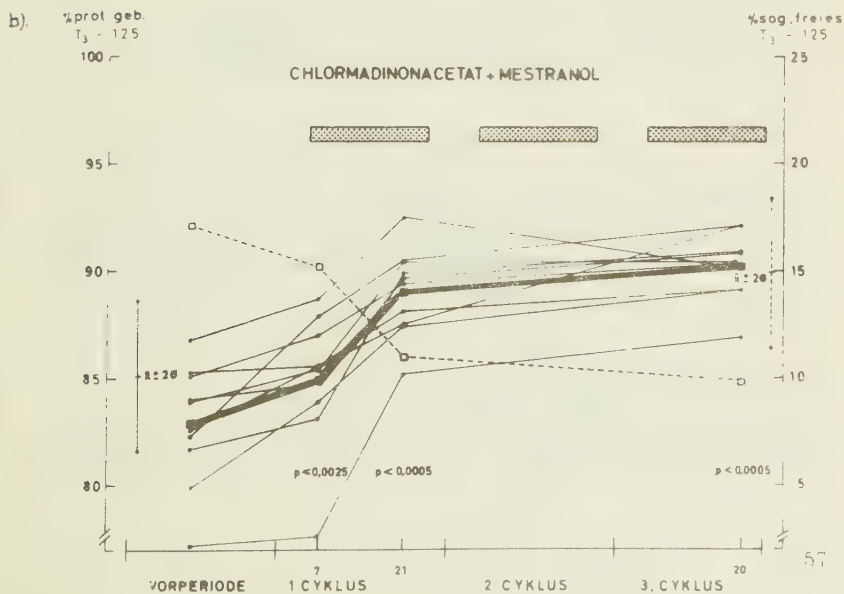
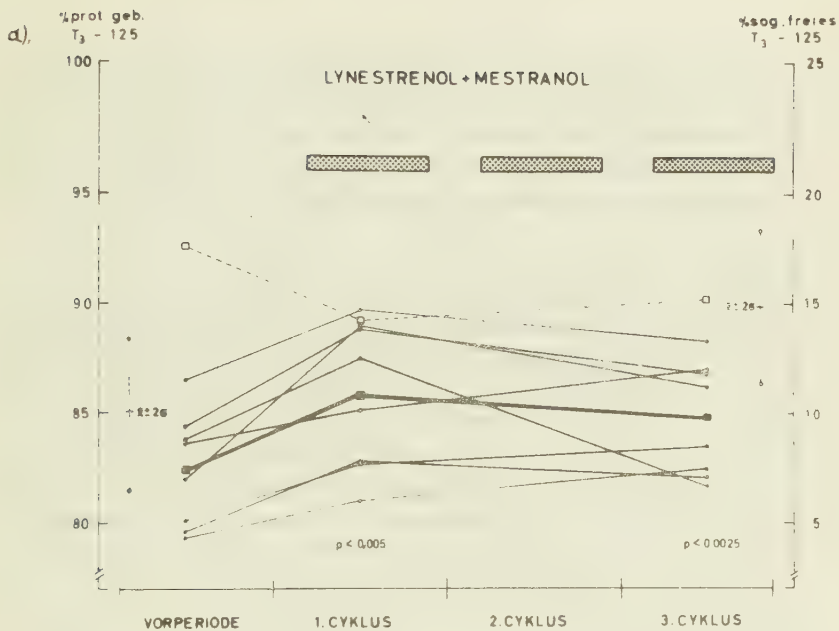
Bei der ersten Untersuchungsreihe fanden wir eine signifikante Zunahme des prozentualen Anteils an proteingebundenem  $\text{T}_3$ -125 (Abb. 10a) von der ersten zur zweiten Abnahme ( $p < 0,005$ ), der jedoch von der zweiten zur dritten Abnahme deutlich wieder abnimmt, aber immer noch signifikant höher liegt als bei der ersten Abnahme ( $p < 0,0025$ ). Die Werte des sog. freien  $\text{T}_3$  verhalten sich analog zu denen des proteingebundenen  $\text{T}_3$ , es zeigte sich folglich eine entsprechende Abnahme des sog. freien Anteils an  $\text{T}_3$  (Abb. 10a).

Abb. 10: Proteingebundener und sog. freier Anteil an L-Trijodthyronin-125 Jod im Serum vor und unter Behandlung

a) mit Lynestrenol + Mestranol

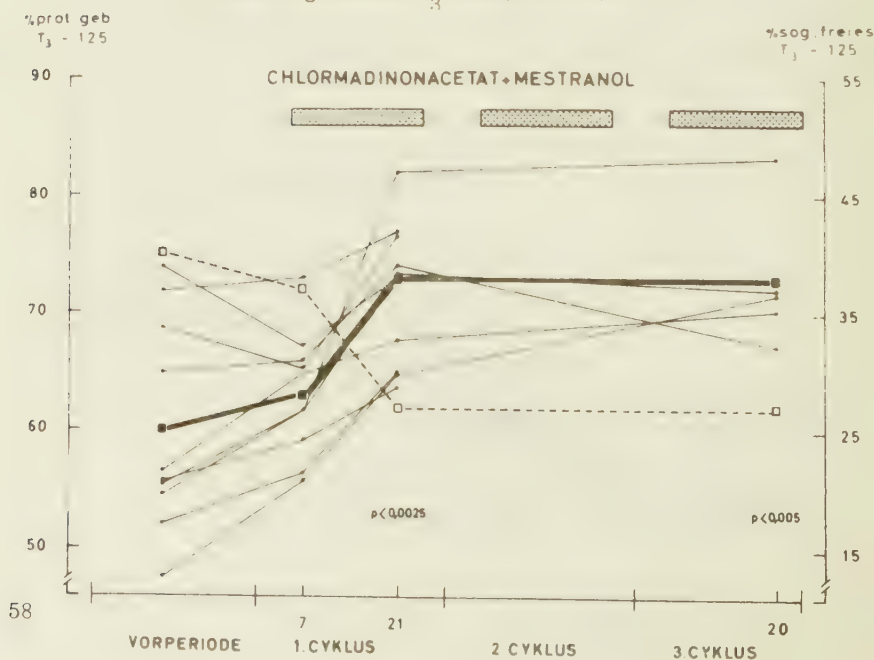
b) mit Chlormadinonacetat + Mestranol

Behandlungsschema und Methodik s. Text. Angegeben sind Einzelwerte (●—●) und Mittelwerte (■—■) des protein- gebundenen und Mittelwerte des sog. freien Anteils an  $\text{T}_3$ -125 (□—□). Der Normalbereich des proteingebundenen Anteils an  $\text{T}_3$ -125 im Serum ( $\bar{x} \pm 2 \text{ S}$ ) ist grau getönt eingezeichnet.



Bei der zweiten Untersuchungsreihe fanden wir einen signifikanten Anstieg des prozentualen proteingebundenen  $T_3$ -125 bei entsprechender Abnahme des sog. freien  $T_3$  von Abnahme zu Abnahme, also signifikanter Anstieg von der ersten zur zweiten Abnahme ( $p < 0,0025$ ), von der zweiten zur dritten ( $p < 0,0005$ ) und von der dritten zur vierten ( $p < 0,05$ ), wobei die Mittelwerte der dritten und vierten Abnahme schon außerhalb des Normalbereichs liegen (Abb. 10b)

Abb. 11: Proteingebundener und sog. freier Anteil an L-Trijodthyronin- $^{125}$  Jod im Serum bei gleichzeitigem Angebot von "kaltem" Trijodthyronin- $^{127}$  Jod (Verdrängungsversuch) vor und unter Behandlung mit Chlormadinonacetat + Mestranol. Wie unter Methoden angegeben, wurde Serum neben dem  $T_3$ -125 zusätzlich mit nicht markiertem Trijodthyronin- $^{127}$  Jod inkubiert und chromatographiert. Behandlungsschema und Methodik s. Text. Angegeben sind Einzel- (—●—) und Mittelwerte (—■—) des proteingebundenen Anteils an  $T_3$ -125 sowie Mittelwerte des sog. freien  $T_3$ -125 (—□—).



Im Verdrängungsversuch (s. "METHODEN") war der Anstieg des proteingebundenen Anteils an  $T_3$ -125 unter der Behandlung mit Chloradinonacetat + Mestranol noch deutlicher (Abb. 11), aber auf Grund der erheblich stärkeren Streuung der Einzelwerte konnten mathematisch nur schlechtere bzw. keine Signifikanzen berechnet werden (27).

Die leichte Diskrepanz zwischen den beiden Versuchsreihen ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß in der ersten Gruppe von Patientinnen auf den Zeitpunkt des Zyklus, zu dem die Blutentnahmen erfolgten, nicht streng geachtet wurde. FRERICHS und Mitarbeiter (87) haben kürzlich berichtet, daß die Glukosetoleranz, also der  $k_G$ -Wert von der ersten zur zweiten Zyklushälfte abnimmt. Ob solche zyklusabhängigen Schwankungen auch für die Bindungsverhältnisse von Schilddrüsenhormonen gelten, ist noch nicht geklärt. Möglicherweise ist auch der unterschiedlich hohe Oestrogengehalt der beiden Präparate von Bedeutung.

Unter der Gabe von Antiovalantien konnten wir also einen Anstieg sowohl des proteingebundenen Jods, als auch des prozentualen Anteils an proteingebundenem  $T_3$  feststellen (61). Die klinische Bedeutung dieser Befunde ist in der "DISKUSSION" besprochen.

## 2. Schilddrüsenfunktion bei Adipositas

Die Adipositas gehört zu den häufigsten Leiden der Bevölkerung zivilisierter Länder. Die weitaus größere Anfälligkeit für degenerative Erkrankungen und die höhere Mortalität der Übergewichtigen ist statistisch gesichert - so wurde von der Fettsucht sogar als "Volksseuche" besprochen (62, 63).

Über das Wesen der Fettsucht sind zahlreiche, sich zum Teil widersprechende Ansichten geäußert und verschiedene Formen beschrieben worden: Die alimentäre Adipositas als einfache Bilanzfrage, rasche

Gewichtszunahmen nach Operationen wie Cholecystektomien mit erhöhter Diabetesfrequenz und medikamentöser Behandlung wie mit Cortisol und thyreostatischen Präparaten, ferner cerebral und echt endokrin bedingte Fettsuchtformen (Hyperinsulinismus, Cushing-Syndrom) (62, 63).

Bei der Adipositas wurden eine starke Erhöhung der Insulin-ähnlichen Aktivität (ILA) (64-66) und exzessive Serum-Insulin-Konzentrationen nach Glukosestimulation (67) nachgewiesen. BOTTERMANN und Mitarbeiter (66, 68) konnten eine Zunahme der Insulinaktivität auf eine Vermehrung der mit Antikörpern hemmbaren Anteile des Seruminsulins zurückführen. SCHTEINGART et al. (69) stellte einen Anstieg der Nebennierenrinden-Funktion in 60 % der Fälle von Adipositas fest. KARL und RAITH (70) beschrieben eine Veränderung des Steroidstoffwechsels und eine Störung des 24-Stunden-Rhythmus der Cortisolsekretion. BENOIT und DURRANCE (71) fanden verminderte Grundumsatzraten und signifikant kürzere Halbwertszeiten des Radiothyroxins bei normalem PBI und <sup>131</sup>Iod-Speicherung, dagegen stellten FLEISCH und RIES (72) einen gegenüber den Normalpatienten gesteigerten Grundumsatz bei Adipösen fest. GOLDBERG et al. (73) wiederum zeigten einen signifikant niedrigeren bzw. fehlenden Anstieg der freien Fettsäuren im 30-Minuten-Adrenalin-Test bei signifikant verlängerten Achillessehnenreflexen und einer Tendenz zu niedrigen PBI- und Radiojodspeicherungswerten; diese Befunde zeigten eine gute Ansprechbarkeit auf Trijodthyronin.

Bei der komplexen Problematik der Pathogenese der Adipositas erschien uns eine Untersuchung der Schilddrüsenfunktion bei diesen Patienten von Interesse. Wir bestimmten bei einer Gruppe von 19 Patienten mit extremer Fettsucht, bei denen klinisch keine Anzeichen einer Hypothyreose festgestellt werden konnten, das proteingebundene Jod ( $PB^{127}I$ ) und den prozentualen Anteil des proteingebundenen und sog. freien Trijodthyronin-<sup>125</sup>Jods ( $T_3^{125}$ ). Das Durchschnittsge-

wicht unserer Patienten lag sehr hoch ( $\bar{x} = 106$  kg), es lag durchschnittlich ( $n = 15$ ) um 51 % über dem Normalgewicht, das entsprechenden Tabellen entnommen wurde (27).

Tab. 1: Adipöse Patienten

|                                                                                    | Mittelwert      | Minimum | Maximum |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------|---------|
| Alter (in Jahren)                                                                  | 34,6            | 15      | 58      |
| Größe (in cm)                                                                      | 174             | 158     | 188     |
| Gewicht (in kg)                                                                    | 106             | 84      | 134     |
| Übergewicht (in %)                                                                 | 51              | 28      | 80      |
| PB <sup>127</sup> I (ug%) ( $\bar{x} \pm$ )                                        | 4,7 $\pm$ 1,25  | 2,8     | 7,6     |
| proteingebundenes T <sub>3</sub> -125 (%) ( $\bar{x} \pm$ )                        | 88,1 $\pm$ 2,75 | 83,0    | 92,5    |
| sog. freies T <sub>3</sub> -125 (%) ( $\bar{x} \pm$ )                              | 11,9 $\pm$ 2,75 | 7,5     | 17,0    |
| proteingebundenes T <sub>3</sub> -125 (%) im Verdrängungsversuch ( $\bar{x} \pm$ ) | 65,7 $\pm$ 6,2  | 48,4    | 75,9    |

Diese Werte (Tab. 1) wurden mit denen einer Gruppe von 31 Gesunden verglichen: PB<sup>127</sup>I: 5,3 ug%  $\pm$  0,83

proteingebundenes T<sub>3</sub>-125: 85,1 %  $\pm$  1,77

sog. freies T<sub>3</sub>-125:  $\bar{x} = 14,9$  %  $\pm$  1,77

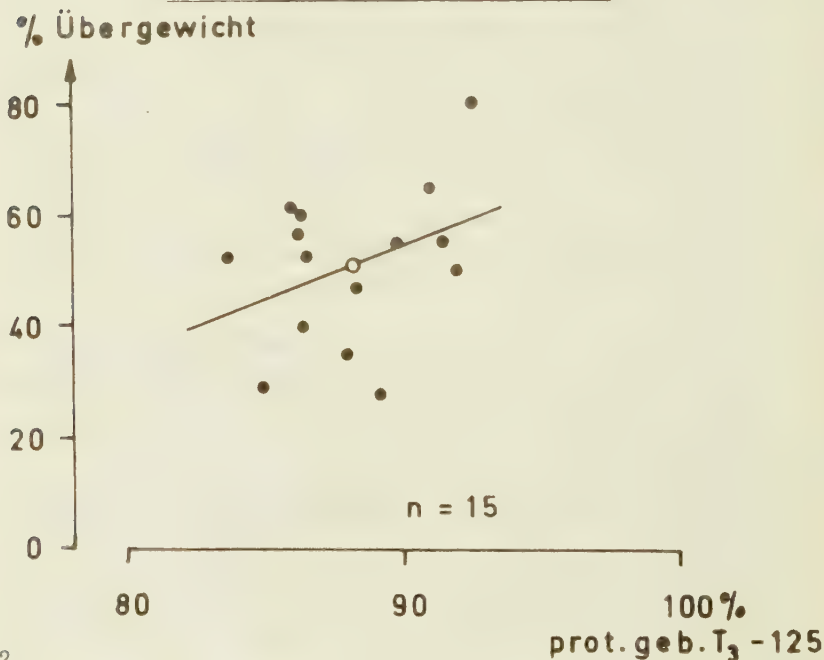
proteingebundenes T<sub>3</sub>-125 im Verdrängungsversuch:  $\bar{x} = 67,0$  %  $\pm$  3,27.

Das PB<sup>127</sup>I lag bei den adipösen Patienten im Normalbereich - nur 3 von 19 Werten lagen unterhalb der Norm - es war jedoch im Mittel signifikant (27) niedriger als bei den gesunden ( $p = 0,05$ ), der Anteil

an proteingebundenem  $T_3$ -125 lag im Mittel ebenfalls noch im Normalbereich - hier lagen 8 Werte oberhalb der Norm - und war signifikant höher ( $p < 0,005$ ), der sog. freie Anteil entsprechend signifikant niedriger als bei der Kontrollreihe der Gesunden. Im Verdrängungsversuch (s. "METHODEN") dagegen lag der proteingebundene Anteil an  $T_3$ -125 bei den Adipösen im Mittel niedriger (nicht signifikant) als bei den Gesunden.

Eine scheinbare Korrelation (27) zwischen dem proteingebundenen  $T_3$ -125 und Übergewicht ließ sich mathematisch nicht verifizieren. Der Korrelationskoeffizient betrug nur + 0,37 und ist bei einer Zahl von 15 Patienten noch nicht signifikant gegen Null verschieden, der Regressionskoeffizient (27) betrug 1,87 (Abb. 12). Die klinische Bedeutung dieser Befunde ist in der "DISKUSSION" besprochen.

Abb. 12: Beziehung zwischen proteingebundenem  $T_3$ -125 (Abszisse)  
und Übergewicht (Ordinate) bei Fettsucht



### 3. Histologische Myelotomiebefunde bei Schilddrüsenerkrankungen

Über die Beziehungen von Hyperthyreose und Skelettveränderungen liegen zur Zeit nur wenige Befunde vor und diese meist aus den Jahren um 1930. Bei den von v. RECKLINGHAUSEN, ASKANAZY, HUNTER und FOLLIS beschriebenen Fällen kam jedoch nur autoptisch gewonnenes Material zur Untersuchung. In allen Fällen wurde von einer "Osteodystrophie" bzw. einer "Ostitis fibrosa", teilweise kombiniert mit einer Osteomalacie berichtet. In klinischen Arbeiten wird andererseits häufig die Hyperthyreose als Ursache einer Osteoporose angeführt. Auf Grund von moderneren Untersuchungen mit radioaktiven Isotopen und Calciumbilanzen berichteten FRASER, KRANE und HAAS von erhöhtem Knochenan- und abbau bei Hyperthyreose (Lit. s. 24). Je nach Relation der beiden Vorgänge resultiert eine positive, ausgeglichene oder negative Bilanz. DAMBACHER und Mitarbeiter (24) haben diese Befunde mittels morphometrischer Messungen an histologischen Knochenschnitten bei 16 Patienten mit der klinischen Diagnose Hyperthyreose überprüft. Als Maß der Knochenbilanz wurde das Verhältnis Osteoblasten zu Osteoklasten bestimmt<sup>x)</sup>.

Auf Grund der Ergebnisse (vgl. Abb. 13) ließen sich die Patienten in vier Gruppen einteilen; Eine erste Gruppe zeigte ein Osteoblasten/Osteoklasten-Verhältnis, das dem Ruheumsatz bei ausgeglichener Bilanz entsprach (3 Patienten). Bei einer zweiten Gruppe mit 7 Patienten wurde ein gesteigerter Abbau bei proportional gesteigertem Anbau gefunden. Trotz bis zu siebenfach erhöhtem Umsatz resultierte eine ausgeglichene Bilanz. Eine dritte Gruppe mit 2 Patienten zeigte einen Knochenabbau ohne entsprechenden Anbau, d. h. eine negative Skelettbilanz. Als vierte Gruppe fanden sich vier Patienten mit normalem oder gesteigertem Anbau ohne entsprechenden Abbau, also mit einer

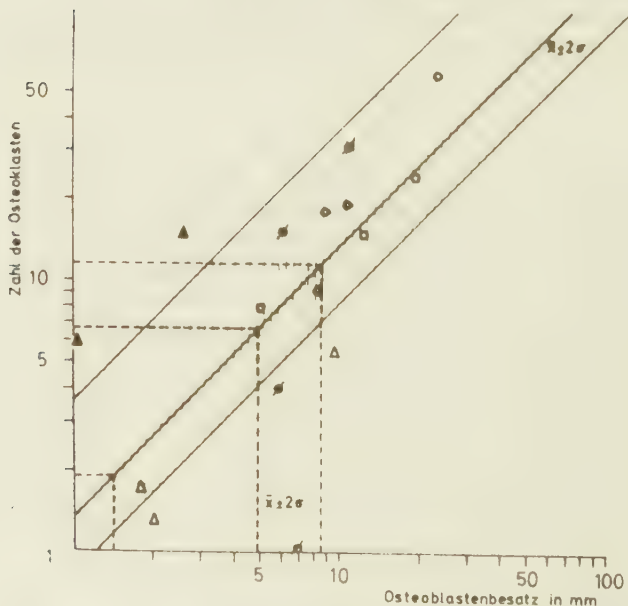
---

x) Herrn Dr. M. Dambacher danke ich für die freundliche Überlassung seiner Befunde.

positiven Knochenbilanz. Die Diagnose einer Hyperthyreose wurde bei den Patienten auf Grund des klinischen Bildes, des Radiojodspeicherungstestes sowie der  $PB^{127}I$ -Bestimmung gestellt.

Abb. 13: Knochenumbau und Bilanz in Abhängigkeit vom Schilddrüsenfunktionszustand

Wie im Text ausgeführt, wurde die Knochenbilanz als Verhältnis von Osteoblasten (Abszisse) zu Osteoklasten (Ordinate) bestimmt. Aufgezeichnet ist der Ruheumsatz von Normalpersonen mit  $2\sigma$ -Bereich (≡≡≡) sowie der  $2\sigma$ -Bereich der ausgeglichenen Knochenbilanz (|||||). In das Diagramm wurden die Werte von 3 Patienten mit schwerer Thyreotoxikose ( $\Delta$ ), 7 Patienten mit weniger schwerer Hyperthyreose ( $\circ$ ) und 2 Patienten mit ausreichend therapierter Thyreotixikose ( $\blacktriangle$ ) eingetragen. 4 Fälle standen uns zur Untersuchung nicht zur Verfügung ( $\emptyset$ )



Knochenanbau  
Knochenabbau bezogen auf 100 mm Bälkchenumfang

An 12 von den 16 Patienten konnte von uns zu dem Zeitpunkt der Myelotomie eine Bestimmung des Schilddrüsenfunktionszustandes mittels der Methode der Bestimmung der  $T_3$ -125-Bindung durchgeführt werden. Dabei fanden wir drei schwere Thyreotoxikosen (Abb. 13), von denen zwei in der vierten Gruppe, also mit positiver Knochenbilanz (von den vier Patienten dieser Gruppe konnten leider nur diese beiden bestimmt werden) und einer in der ersten Gruppe (Ruheumsatz mit ausgeglichener Bilanz, aber nahe der unteren  $2\text{ } \mathcal{G}$ -Grenze) eingeordnet waren. Der zweite Patient der ersten Gruppe (Ruheumsatz) war nach unseren Laborwerten eine fragliche Hypothyreose (an der Grenze des Normalbereiches), während der dritte Patient der ersten Gruppe (an der Grenze des  $2\text{ } \mathcal{G}$ -Bereiches zur zweiten Gruppe) und die gesamte zweite Gruppe (mit gesteigertem Umsatz aber ausgeglichener Bilanz) als weniger schwere Hyperthyreosen (sog. freier Anteil an  $T_3$ -125 von 21 % bis 26 % - Bereich der Euthyreosen 12 % bis 18 %) beurteilt wurden.

Die beiden Patienten mit negativer Knochenbilanz (dritte Gruppe) waren zum Zeitpunkt der Myelotomie nach ausreichender Behandlung einer schweren Thyreotoxikose euthyreot.

Bei der geringen Anzahl der untersuchten Patienten ergab sich bei uns keine Korrelation (27) zwischen der Schwere der Thyreotoxikose und den entsprechenden Skelettveränderungen. Die Meßwerte dieser vier sich ergebenden Gruppen könnten bei unseren hyperthyreoten Patienten, wenn man nach den Ergebnissen der Laboruntersuchungen urteilt, aber auf eine Tendenz von normalem Knochenab- und -aufbau mit ausgeglichener Bilanz zu einer Steigerung des Umbaus bei ebenfalls ausgeglichener Bilanz hinweisen. Diese Tendenz ließe sich freilich erst durch eine noch größere Untersuchungsreihe sichern.

Nach dem klinischen Urteil muß man sich vorläufig der Meinung von JOWSEY (88) anschließen, daß keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Störung des Knochenanbaus und -abbaus und dem Schweregrad der Thyreotoxikose besteht, solange man sich hier auf Laboratoriumswerte ( $\text{PB}^{127}\text{I}$ ,  $\text{T}_3$ -Bindung) stützt. Das stimmt auch mit der Tatsache überein, daß die Schwere der klinischen Symptomatik und das Ausmaß der Störung der Laborwerte keineswegs streng korreliert sind.

Ein Vergleich unserer Ergebnisse mit denen dazu konträren Autopsiefunden der oben aufgeführten Autoren ist natürlich nicht ohne weiteres möglich, da die Skelettveränderungen sicher nicht nur von dem Schweregrad der Hyperthyreose abhängen, sondern in erheblichem Maße auch von der Krankheitsdauer. Derart schwere Fälle, die über viele Jahre verliefen und gar ad exitum führten, wurden bei uns jedoch nicht beobachtet. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um das Bild der Skelettveränderung bei Hyperthyreose besser umreißen zu können.

#### 4. Veränderungen des EEGs bei Hyperthyreose

Es ist lange umstritten gewesen, ob die Schilddrüsenhormone einen Einfluß auf den Gehirnstoffwechsel haben. Messungen aus jüngster Zeit zeigten jedoch, daß bei hyperthyreoten Patienten die Sauerstoffaufnahme und Glukoseverwertung gesteigert sind (74, 75). Dazu paßt die klinische Beobachtung, daß bei schwerer Thyreotoxikose die cerebrale Funktion erheblich beeinträchtigt sein kann. Diese meist im Rahmen einer thyreotoxischen Krise auftretende thyreotoxische Encephalopathie (76) ist klinisch durch Verwirrheitszustände und den raschen Wechsel von Somnolenz und erheblicher motorischer Unruhe gekennzeichnet, sie kann zum Basedow-Coma führen. In unserer Klinik wurde in der letzten Zeit über die Frage gearbeitet, ob das Ausmaß der Beeinträchtigung der cerebralen Funktion bei der Thyreotoxikose anhand der Veränderungen im EEG erfaßt werden kann (25).

Die Literatur über EEG-Veränderungen bei Hyperthyreose ist widersprüchlich. Es wurden einerseits langsame Rhythmen, andererseits von anderen Autoren eine Frequenzzunahme des Alpha-Rhythmus beschrieben (77-84). Für die Hyperthyreose spezifische Veränderungen gibt es natürlich nicht. So sollte hier geprüft werden, ob die Schwere der EEG-Veränderungen als Ausdruck der Schwere der Encephalopathie aufgefaßt werden könne und somit das Drohen einer gefährlichen Basedow-Krise aufzeigen könne. Außerdem sollte eine sorgfältige Schilddrüsenfunktionsdiagnostik diesen elektroencephalographischen Untersuchungen zugrunde gelegt werden, weil ein Teil der Diskrepanzen um die EEG-Befunde bei der Thyreotoxikose sicher auf eine nicht ausreichende Sicherung der Hyperthyreose durch Laboratoriumsbefunde zurückzuführen sind. In diesem Sinne verstehen wir die Beobachtung, daß das Auftreten von langsamen Frequenzen Ausdruck einer schweren Thyreotoxikose mit Encephalopathie ist (25).

Unser Krankengut ließ sich zweckmäßigerweise in Patienten mit leichter Hyperthyreose und solche mit schwerer Thyreotoxikose einteilen. Wir haben Laboratoriumsbefunde ( $PB^{127}I$  und  $T_3$ -125-Bindung) und EEG-Befunde<sup>x)</sup> tabellarisch zusammengefaßt:

Tab. 2: Schwere Thyreotoxikosen (Basedow-Krise)

| Name    | $PB^{127}I$  | prot. geb.<br>$T_3$ -125 | sog. freies<br>$T_3$ -125 | EEG-Befund                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------|--------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| E. E.   | 20 $\mu g\%$ | 34,5 %                   | 65,2 %                    | Delta-Parenrhythmie bei ungenügender Reagibilität beim Augenöffnen. Diffuse Theta-Wellen-Überlagerungen, mittelschwere Allgemeinveränderungen.                                                                                                                                                             |
| L. H.   | 14 $\mu g\%$ | 46,3 %                   | 53,7 %                    | Bilaterale linkstemporal betonte, hohe Delta-Gruppen im Sinne der Delta-Parenrhythmie. Fokale Betonung als Ausdruck einer cerebralen, vaskulären Insuffizienz. Mittelschwere bis schwere Allgemeinveränderungen.                                                                                           |
| Sch. L. | 11 $\mu g\%$ | 51,4 %                   | 48,7 %                    | Delta-Parenrhythmie bei ungenügender Reagibilität auf Lidschluß. Vorübergehend fokale Delta-Wellen in der linken Temporalregion. Cerebrale, vaskuläre Insuffizienz. Mittelschwere bis schwere Allgemeinveränderungen.                                                                                      |
| Sch. I. | 18 $\mu g\%$ | 61,1 %                   | 38,9 %                    | Dysrhythmisches EEG mit überwiegender, hoher Delta- und Theta-Tätigkeit und fehlender Reagibilität. Zahlreiche steile Abläufe. Schwere Allgemeinveränderungen (erhebliche Verlangsamung bei vorher schon 2,5 - 6 c/s Grundtätigkeit. Später weitgehende Normalisierung nach Behandlung der Thyreotoxikose. |

x) Frau Dr. A. Kollmannsberger danke ich für die freundliche Überlassung der EEG-Befunde.

Tab. 3: Hyperthyreosen, zum Teil anbehandelt

| Name  | PB $^{127}\text{I}$  | prot. geb.<br>$\text{T}_3$ -125 | sog. freies<br>$\text{T}_3$ -125 | EEG-Befund                                                                         |
|-------|----------------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| L. A. | 20 $\mu\text{g}\%$   | 65,3 %                          | 34,7 %                           | verlangsamter Grundrhythmus<br>(7 - 8 c/s)                                         |
| L. J. | 13,6 $\mu\text{g}\%$ | 65,1 %                          | 34,9 %                           | etwas rascher Grundrhythmus, von<br>Normvariante nicht unterscheidbar              |
| G. K. | 20 $\mu\text{g}\%$   | 66 %                            | 34 %                             | rascher Grundrhythmus, von Norm-<br>variante nicht unterscheidbar                  |
| T. G. | 20 $\mu\text{g}\%$   | 67,2 %                          | 32,8 %                           | normal                                                                             |
| K. J. | 10,6 $\mu\text{g}\%$ | 70,4 %                          | 29,6 %                           | rascher Grundrhythmus (12 c/s),<br>von Normvariante nicht unterscheid-<br>bar      |
| M. F. | 14,4 $\mu\text{g}\%$ | 72,4 %                          | 27,6 %                           | vermehrt diffuse flache Theta-<br>Wellen                                           |
| M. M. | 18,6 $\mu\text{g}\%$ | 73,7 %                          | 26,4 %                           | etwas schneller Grundrhythmus,<br>von Normvariante nicht unter-<br>scheidbar       |
| L. E. | 11,4 $\mu\text{g}\%$ | 74,1 %                          | 25,9 %                           | normales EEG                                                                       |
| L. J. | 3,2 $\mu\text{g}\%$  | 74,9 %                          | 25,2 %                           | rascher Grundrhythmus, von Norm-<br>variante nicht unterscheidbar<br>(11 - 12 c/s) |
| K. S. | 8,0 $\mu\text{g}\%$  | 78,9 %                          | 21,2 %                           | rascher Grundrhythmus, von Norm-<br>variante nicht unterscheidbar                  |
| O. I. | 11,2 $\mu\text{g}\%$ | 81,7 %                          | 18,3 %                           | etwas rascher Grundrhythmus<br>(12 c/s), von Normvariante nicht<br>unterscheidbar  |

Tab. 4: Ausreichend therapierte Hyperthyreosen

| Name   | PB $^{127}\text{I}$  | prot. geb.<br>$\text{T}_3$ -125 | sog. freies<br>$\text{T}_3$ -125 | EEG-Befund                                                                     |
|--------|----------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| St. A. | 20 $\mu\text{g}\%$   | 81,2 %                          | 18,8 %                           | medikamentös gestört (Sedativa),<br>sonst normal                               |
| M. M.  | 5,4 $\mu\text{g}\%$  | 81,9 %                          | 18,1 %                           | normal                                                                         |
| C. F.  | 9,2 $\mu\text{g}\%$  |                                 | 16,2 %                           | normal                                                                         |
| P. P.  | 8,4 $\mu\text{g}\%$  | 85 %                            | 15 %                             | normal                                                                         |
| P. W.  | 2,6 $\mu\text{g}\%$  | 85,5 %                          | 14,6 %                           | normal                                                                         |
| V. E.  | 7,8 $\mu\text{g}\%$  | 89 %                            | 11,2 %                           | rascher Grundrhythmus (12 c. s),<br>von Normvariante nicht unter-<br>scheidbar |
| B. A.  | 10,6 $\mu\text{g}\%$ | 89,1 %                          | 11 %                             | normal                                                                         |
| S. Th. | 2 $\mu\text{g}\%$    | 90,8 %                          | 9,2 %                            | ungenügende Blockierung bei<br>Augenöffnen, sonst normal                       |

Bei den Patienten mit schwerer thyreotoxischer Enzephalopathie (Tab 2) waren deren Laborwerte (PB  $^{127}\text{I}$  und  $\text{T}_3$  -125-Bindung) extrem pathologisch. fanden wir in allen Fällen eine Rückbildung der EEG-Befunde mit thyreostatischer Therapie (Tab 3). Die Laborwerte besserten sich dagegen erst im Zuge der vollständigen Rückbildung der Hyperthyreose (Tab 4). Auffallend ist, daß bei einer Reihe von behandelten Patienten, die klinisch bereits euthyreot waren, die  $\text{T}_3$  -125-Bindungswerte hoch - die sog. freien Anteile niedrig - waren, während das PB  $^{127}\text{I}$  zum Teil noch erheblich erhöht war. Wir können nicht in allen Fällen übersehen, ob bei diesen Patienten eine Behandlung z. B. Endojodin durchgeführt wurde, oder ob hier die Korrelation von PB  $^{127}\text{I}$  und  $\text{T}_3$  -Bindungsverhältnissen (10, 11, 15) gestört ist. Man muß unter Umständen

damit rechnen, daß nicht hormonaktives proteingebundenes Jod (z. B. Thyreoglobulin?) nach  $^{131}\text{I}$ -Jod-Therapie im peripheren Blut nachweisbar wird (86).

## IX. DISKUSSION

Die Bedeutung der Serumeiweißkörper als Vehikel für den Transport verschiedenster Substanzen im Blut ist eng mit dem Namen v. BENNHOLD verknüpft. So sind auch Hormone im Blut nicht nur in freier Form, sondern teils an Eiweißkörper, teils an Erythrocyten gebunden. Diese Betrachtungsweise hat nicht nur das Verständnis für die Pathophysiologie verschiedenster Krankheiten bereichert, sondern auch das diagnostische Spektrum erweitert.

Wie in der "EINLEITUNG" kurz angeführt, bedienen sich die an der Schilddrüsenfunktion interessierten Endokrinologen seit den grundlegenden Arbeiten von HAMOLSKY (1, 2) verschiedener Verfahren, um die Proteinbindungsverhältnisse der Schilddrüsenhormone im Blut zu analysieren. Im "ERGEBNIS" Teil wurde bereits ausgeführt, daß je nach Art des angewandten Verfahrens dabei recht unterschiedliche Befunde erhoben wurden. So läßt sich keineswegs immer aus den entsprechenden Ergebnissen ein Rückschluß auf die physiologische "Konzentration" an freien Schilddrüsenhormonen gewinnen, wenn man z. B. die Methoden Dialyse (18, 19), Erythrocyten-Uptake (1, 2), Anionenaustauscherspeicherung (3-6) und Dextrangelfiltration (7-15) benutzt. Für den Kliniker ist wichtiger, daß jedes dieser Verfahren bei geeigneter Anwendung bestimmte Aussagen über den Schilddrüsenfunktionszustand erlaubt.

Von unserem Arbeitskreis wurde früher die Ansicht geteilt, daß die Serumproteinbindungsverhältnisse für Trijodthyronin im wesentlichen von dem Gehalt des Serums an Thyroxin bestimmt werden (34, 10-15) - Es erhob sich sogar die Frage, ob nicht das Trijodthyronin selbst, sondern dessen Verunreinigung mit Thyroxin (s. unter Dünnschichtchromatographie m.) den wesentlichen Anteil des Verdrängungseffektes ausmachte. - Jene Meinung müssen wir nach unseren jetzigen Ergeb-

nissen in Zweifel ziehen. Wir konnten frühere Ergebnisse, die zeigten, daß Thyroxin in einem wesentlich höheren Prozentsatz proteingebunden ist als Trijodthyronin bestätigen. Auf dieser Beobachtung und auf den Ergebnissen, daß der Thyroxingehalt des Serums zwar höher als der Trijodthyroningehalt, die Trijodthyroninwirkung aber größer als die von Thyroxin ist (20-23) beruht ja die Auffassung, daß die physiologische Bedeutung des freien oder sog. freien Trijodthyronins beträchtlich ist. Die Annahme, daß die Erhöhung des Anteils an sog. freien Trijodthyronin bei Hyperthyreosen ursächlich auf einen höheren Gehalt des Serums an Thyroxin zu beziehen ist, ist nach den im Ergebnis-  
 teil beschriebenen Befunden dagegen zweifelhaft geworden. Nach diesen Untersuchungen ist die verdrängende Wirkung von Thyroxin bei Inkubation von T<sub>3</sub>-125 mit Serum jedoch nur sehr gering. Das ist angesichts der beträchtlich höheren Bindung von Thyroxin erstaunlich. Man muß sich fragen, ob die thyroxinbindenden Komponenten der Serumproteine mit den trijodthyroninbindenden Komponenten alle identisch sind. Selbst wenn alle drei Fraktionen (Präalbumine, Albumine und Thyroxin-bindendes Globulin) beide Hormone binden, wie das nach den elektrophoretischen Untersuchungen zu sein scheint, so besagt das noch nicht, daß die Bindungsstellen für beide Hormone die gleichen sind. Weitere Versuche wären erforderlich, um diese Fragen zu klären.

Die Bestimmung des proteingebundenen Jods, die bei uns modifiziert nach BARKER durchgeführt wurden (5, 10, 14), gab den Endokrinologen eine erste Problemöglichkeit, auf die Schilddrüsenhormonkonzentration im Serum zu schließen. Diese klinisch so enorm wichtige Methode ist allerdings recht störungsanfällig. Eine neue Störungsmöglichkeit hat sich durch die immer breitere Anwendung von Antioxydantien ergeben. Eine Zunahme der Eiweißbindung von Hormonen unter Östrogentherapie ist bekannt. So steigt das proteingebundene Jod

bei vermehrtem thyroxinbindenden Globulin (TBG) während einer Schwangerschaft an. Derselbe Effekt wurde auch schon unter Antiovu-  
lantien-Therapie beschrieben (47-52, 61). Wie im Ergebnisteil schon  
ausgeführt, fanden wir einen signifikanten Anstieg des PBI-127 und des  
prozentualen Anteils an proteingebundenem  $T_3$ -125 bei entsprechender  
Abnahme des sog. freien Anteils. Es ist wichtig, sich klar vor Augen  
zu halten, daß der nicht unwesentliche Eingriff in die hormonelle  
Regulation durch die Antiovu-  
lantien-Therapie (46, 54-60) für das Ge-  
biet der Schilddrüsenfunktion im wesentlichen laboratoriumstechnische  
Bedeutung hat. Die PBI-Werte steigen an. Das kann zu einer irrüm-  
lichen Diagnose einer Hyperthyreose führen. Eine solche liegt jedoch  
nicht vor, wie man bei Bestimmung der Trijodthyroninbindungsver-  
hältnisse ohne weiteres erkennen kann. Das Produkt von PBI, welches  
etwa dem Thyroxingehalt parallel geht, und der prozentuale Anteil  
an freien oder sog. freien Trijodthyronin ergibt mit und ohne Anti-  
ovulantien-Therapie etwa gleiche Werte. Nachdem der freie Anteil  
des Hormons für die biologische Wirkung zuständig ist, kann man aus-  
sagen, daß eine euthyreote Funktion vorliegt.

Eine ganze Reihe von Autoren haben sich mit Stoffwechselanomalien,  
insbesondere auch mit Schilddrüsenfunktionsänderungen bei Adipositas  
beschäftigt (62-73). Eine grobe Schilddrüsenunterfunktion liegt bei  
"üblicher" alimentärer Adipositas bestimmt nicht vor. Aber auch bei  
uns fand sich ebenso wie bei früheren Untersuchern (71, 73), daß die  
Mittelwerte der Indices der Schilddrüsenfunktion, die wir untersuchten,  
bei Adipösen etwas unter denen der Mittelwerte der Gesunden lagen.  
Das wird besonders deutlich, wenn man das Kollektiv der Gesunden  
von den in Bayern so häufigen Trägern kleiner Strumen säubert und  
damit Mittelwerte tatsächlich Schilddrüsengesunder aufstellt. Uns er-  
scheint es weniger wichtig zu entscheiden, ob bei der "alimentären"

Adipositas für deren Entstehung eine Schilddrüsenunterfunktion eine Rolle spielt. Dieser Schluß ist bei dem relativ kleinen Zahlenmaterial sicher nicht möglich. Die angeführten Befunde geben aber eine rationale Basis für die von so vielen Ärzten praktizierte, vorsichtige Behandlung der Adipositas mit Schilddrüsenhormonen. Es ist klar, daß wir nicht der Erzeugung einer Thyreotoxicosis factitia bei Adipösen das Wort reden wollen. Beschränkung der Kalorienzufuhr und eine leichte Steigerung des Stoffwechsels können bei vernünftiger Steuerung durch den Arzt zu erfreulichen Behandlungsergebnissen führen.

## X. ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Die Methode der Bestimmung des proteingebundenen und sog. freien Anteils an L-Trijodthyronin- $^{125}$ Jod im Serum mittels Dextrangelfiltration wurde neben anderen Methoden zur Prüfung des Schilddrüsenfunktionszustandes benutzt. Das von uns verwendete  $^{125}$ Jod markierte Trijodthyronin zeigte sich gegenüber dem  $^{131}$ Jod markierten wegen der längeren Halbwertszeit und ebenso wegen seiner relativen chemischen Stabilität, die mit den Verfahren der Dünnschicht- und Papierchromatographie überprüft wurde, von wesentlichem Vorteil. Die Arbeit beschreibt methodische Untersuchungen zur Verbesserung der Technik der Dextrangelfiltration.
- 2) In weiteren Untersuchungen fanden wir, daß Thyroxin zu einer wesentlich geringeren Verdrängung des markierten Trijodthyronins aus seiner Serumproteinbindung führt als nicht markiertes Trijodthyronin.
- 3) Im klinischen Teil der Arbeit sind ausgewählte Fragestellungen behandelt. So bestimmten wir die Schilddrüsenfunktion unter Antioöulantien-Therapie; diese blieb trotz des Anstiegs des proteingebundenen Jods normal, da gleichzeitig der prozentuale Anteil an sog. freien Trijodthyronin abnahm und der freie Hormonanteil ja allein biologisch wirksam ist. Auch unsere Patienten mit extremer Adipositas zeigten noch eine Euthyreose, die Schilddrüsenfunktion war jedoch gegenüber Gesunden deutlich herabgesetzt. Schließlich wurde noch der Grad der Steigerung der Schilddrüsenfunktion bei hyperthyreoten Patienten mit histologischen Myelotomiebefunden und Veränderungen des Elektroencephalogramms untersucht.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. K. SCHWARZ  
danke ich für die freundliche Überlassung  
des Themas.

Besonders herzlich danke ich Herrn Dr. med.  
P. C. SCRIBA für seine unermüdliche Hilfe.

## XI. LITERATURVERZEICHNIS

1. HAMOLSKY, M. W. ,      The Thyroid Hormone Plasma Protein  
M. STEIN, and          Complex in Man. A New In Vitro Method  
A.S. FREEDBERG;      for Study of "Uptake" of Labelled Hor-  
monal Compounds by Human Erythrocytes.  
J. Clin. Endocr. 17, 33 (1957)
  
2. HAMOLSKY, M. W. ,      The Plasma Protein-Thyroid Hormone  
A. GOLDETZ, and      Complex in Man. Further Studies on the  
A.S. FREEDBERG;      Use of the In Vitro Red Blood Cell Uptake  
of  $I^{131}$ -L-Triiodothyronine as a Diagnos-  
tic Test of Thyroid Function.  
J. Clin. Endocr. 19, 103 (1959)
  
3. MITCHELL, M. L. ,      The In Vitro Resin Sponge Uptake of Tri-  
A. B. HARDEN, and      iodothyronine- $I^{131}$  From Serum in Thyroid  
M. E. O'ROURKE;      Disease and in Pregnancy.  
J. Clin. Endocr. 20, 1474 (1960)
  
4. STERLING, K. , and      Resin-Uptake of  $I^{131}$ -Triiodothyronine as  
M. TABACHNICK;      a Test of Thyroid Function.  
J. Clin. Endocr. 21, 456 (1961)
  
5. HORSTER, F. A. und      Die Anwendung von radioaktivem Trijod-  
E. KLEIN;              thyronin zu Diagnostik der Schilddrüsen-  
funktion in vitro.  
Dt. Med. Wschr. 89, 983 (1964)
  
6. GODDEN, D. J. , and      The  $I^{131}$ -Triiodothyronine-Resin-Uptake  
E. S. GARNETT;      Test.  
J. Clin. Endocr. 29, 167 (1964)
  
7. SHAPIRO, B. , and      A Chromatographic Method Utilizing  
J. L. RABINOWITZ;      Sephadex for the Separation of free Iodide,  
Protein Bound and Unbound Triiodothyronine  
in Sera.  
J. Nuclear Med. 3, 417 (1962)

8. RABINOWITZ, J. L. ,      "Sephadex Chromatographic" Test in the  
B. SHAPIRO, and      Evalution of Thyroid Function.  
Ph. JOHNSON:      J. Nuclear Med. 4, 139 (1963)
  
9. STUMPF, W. und      In-vitro-Bestimmung der Schilddrüsen-  
E. H. GRAUL:      funktion mit dem Serum- $^{+}T_3$ -Test.  
Med. Klin. 58, 192 (1963)
  
10. LANDGRAF, R. :      Schilddrüsenfunktionsdiagnostik unter be-  
sonderer Berücksichtigung der Bestimmung  
der Bindung von L-Trijodthyronin an  
Serumproteine mittels Dextran-Gelfil-  
tration  
Inaugural-Dissertation (1966), München
  
11. SCRIBA, P. C. ,      Untersuchungen über die Schilddrüsen-  
H. G. HEINZE,      funktion mit der Bestimmung des Ver-  
R. LANDGRAF,      hältnisses von sog. freien zu proteinge-  
K. W. FREY und      bundenem Trijodthyronin im Serum  
K. SCHWARZ:      mittels Dextran-Gelfiltration.  
Verhdlg. d. Dt. Ges. f. Inn. Med. 1965
  
12. SCRIBA, P. C. ,      The Effect of Excess Triiodothyronine -  
H. G. HEINZE,      127 Added In Vitro on Serum Protein  
R. LANDGRAF,      Bound and Free Triiodothyronine-131.  
K. W. FREY und      Proc. Vth. Internat. Thyroid Conference  
K. SCHWARZ:      Rome 1965, Abstr. 347
  
13. LANDGRAF, R. ,      Clinical Evaluation of Determinations  
H. G. HEINZE,      of Free and Serum Protein Bound Tri-  
K. SCHWARZ und      iodothyronine (Dextran Gel Filtration).  
P. C. SCRIBA:      Vth Acta Endocr. Congress Hamburg  
1965
  
14. SCRIBA, P. C. ,      Bestimmung der Bindung von Trijod-  
R. LANDGRAF,      thyronin an Serumproteine mittel. Dex-  
H. G. HEINZE und      tran-Gel-Filtration  
K. SCHWARZ:      Klin. Wschr. 44, 69 (1966)

15. SCRIBA, P. C.,                      Klinische Bedeutung der Bestimmung der  
H. G. HEINZE,                      Bindung von Trijodthyronin an Serum-  
R. LANDGRAF,                      proteine mittels Dextran-Gel-Filtration  
K. W. FREY und                      Klin. Wschr. 44, 131 (1966)  
K. SCHWARZ;
  
16. CUARON, A. and                      The Binding of  $^{131}\text{J}$ -Triiodothyronine  
M. E. FUCUGAUCHI;                      by Serum Proteins as an In Vitro Test  
                                                    of Thyroid Function.  
                                                    Acta Endocr. 46, 161 (1964)
  
17. CUARON, E;                              The In Vitro Uptake of  $^{131}\text{I}$ -Triiodo-  
                                                    thyronine by Erythrocytes and its Binding  
                                                    by Serum Proteins.  
                                                    Proc. Vth Internat. Thyroid Conference  
                                                    Rome 1965, Abstr. 67
  
18. LEE, N. D.,                              Determination of the Free Thyroxine  
R. J. HENRY, and                      Content of Serum.  
O. J. GOLUB;                              J. Clin. Endocr. 24, 486 (1964)
  
19. STERLING, K.,                              Equilibrium Dialysis Studies of the Bind-  
Ph. ROSEN, and                      ing of Thyroxine by Human Serum  
M. TABACHNIK;                      Albumin.  
                                                    J. Clin. Invest. 41, 1021 (1962)
  
20. KEIDERLING, W.                      Die papierchromatographische Auftren-  
und D. EMRICH;                      nung der  $^{131}\text{J}$ od-Plasmaaktivität als  
                                                    differentialdiagnostisches Hilfsmittel  
                                                    bei Hyperthyreose.  
                                                    Dt. Med. Wschr. 85, 747 (1960)
  
21. RAWSON, R. W.,                      A Dissociation of Thyroid Hormonal  
W. L. MONEY,                      Effect by Structural Alternations of the  
R. L. KROC,                              Thyroxine Molecule  
S. KUMAOKA,                              Am. J. Med. Sci. 238, 261 (1959)  
R. S. BENUA, and                        
R. D. LEEPER;

22. BLACKBURN, C. M. , W. M. McCONAHEY, F. R. Jr. KEATING, and A. ALBERT: Calorigenic Effects of Single Intravenous Doses of L-Triiodothyronine and L-Thyroxine in Myxedematous Persons  
J. Clin. Invest. 33, 819 (1954)
23. BARKER, S. B. : Peripheral Actions of Thyroid Hormons  
Feder. Proc. 21, 635 (1962)
24. DAMBACHER, M. , H. P. VITTALI, P. C. SCRIBA und K. SCHWARZ: Histologisch-morphologische, blut-chemische und röntgenologische Skelettveränderungen bei Hyperthyreosen  
12. Sympos. Dt. Ges. Endokrinol. , Wiesbaden, Springer (1966) im Druck
25. KOLLMANNBERGER, A. , J. KUGLER, K. SCHWARZ und P. C. SCRIBA: Thyreotoxische Encephalopathie  
Revue Neurologique 115 (1967) im Druck
26. FLODIN, P. : Dextran Gels and Their Applications in Gel Filtration  
Dissertation, Uppsala 1962, 85 pp.
27. DIEM, K. : Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen. J. R. Geigy S. A. Basel, 1960, 146 ff
28. MITCHELL, M. L. A. H. BRADFORD, and S. COLLINS: Differences in the Interaction of Triiodothyronine-<sup>131</sup>I with Serum Proteins in Vitro.  
J. Clin. Endocr. Metab. 24, 867 (1964)
29. ALBRIGHT, E. C. , F. C. LARSON, and W. D. DEISS: Thyroxine-Binding Capacity of Serum  $\alpha$ -Globuline in Hypothyroid, Euthyroid and Hyperthyroid Subjects  
J. Clin. Invest. 34, 44 (1955)
30. ROBBINS, J. , and J. E. RALL: Thyroxine-Binding Capacity of Serum in Normal Man  
J. Clin. Invest. 34, 1324 and 1331 (1955)

31. STERLING, K. : Molecular Structure of Thyroxine in Relations to its Binding by Human Serum Albumin  
J. Clin. Invest. 43, 1721 (1964)
32. INGBAR, S. H. : Endocrinology 63, 156 (1958) zitiert nach ROBBINS, J. and J. E. RALL: Protein Associated with the Thyroid Hormones  
Physiolog. Rev. 40, 415 ff (1960)
33. INGBAR, S. H. : The Interaction of the Thyroid Hormones with the Proteins of Human Plasma  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 86, 440 (1960)
34. WILLIAMS, R. H. : Textbook of Endocrinology  
W. B. Saunders Company (1962)  
Philadelphia and London
35. SANTOS, M. A., and J. L. RABINOWITZ: L-Triiodothyronine Binding to Serum Protein. Competition by Thyronine (29072). Proc. of the Soc. for Experimental Biology and Med. 115, 901 (1964)
36. TABACHNIK, M., and N. A. GIORGIO: Thyroxine-Protein Interactions  
Arch. Biochem. Biophys. 105, 563 (1964)
37. STAHL, E. : Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch. Springer-Verlag 1962, Berlin-Göttingen-Heidelberg
38. Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie  
E. MERCK AG, Darmstadt
39. BARKER, S. B. : Further studies on the ceric sulphate-arsenious acid reaction for the detection of various analogues of thyroxine  
Biochem. J. 90 (1964)

40. GRIES, G.,  
K. H. PFEFFER und  
E. J. ZAPPI: Eine Methode der dünn-schichtchromato-graphischen Trennung von schilddrüsen-aktiven Jodaminosäuren  
Klin. Wschr. 43, 515 (1965)
41. HERBERHOLD und  
O. A. NEUMÜLLER: Dünn-schichtchromatographische Unter-suchungen des Lymphbahnhaltendes mensch-licher Schilddrüsen; Trennung von Jod-aminosäuren von autoptischem Material  
Klin. Wschr. 43, 717 (1965)
42. KEIDERLING, W.  
und D. EMRICH: Die papierchromatographische Auftren-nung der J<sup>131</sup>-Plasmaaktivität (D. D. d. Hyperthyreose) als differentialdiagnostisches Hilfsmittel bei Hyperthyreosen  
Dt. Med. Wschr. 85, 747 (1960)
43. ALBRIGHT, E. C.,  
F. C. LARSON, and  
W. P. DEISS: Single Dimension Chromatographic Separation of Thyroxine and Triiodo-tyronine  
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 84, 240 (1955)
44. DIMITRIADOU, A.,  
R. FRASER, and  
P. C. TURNER: Iodothyrosine-like substances in human serum  
Nature 201, 575 (1964)
45. DIMITRIADOU, A.,  
R. FRASER,  
J. D. H. SLATER,  
and P. C. R. TURNER: Staining for Iodine in Chromatogramms of Human Plasma; an Artefact due to Thiourea or Thiouracils  
Nature 187, 691 (1960)
46. GERSHBERG, H.,  
Z. JAVIER, and  
M. HULSE: Glucose Tolerance in Women Receiving an Ovulatory Suppressant  
Diabetes 4, 378 (1964)
47. ALEXANDER, R. W.,  
and J. MARMORSTON: Effect of two Synthetic Estrogens on the Level of Serum Protein Bound Iodine in Men and Women with Atherosclerotic Heart Disease; J. Clin. Endocrinol. 2, 243 (1961)

48. LARSSON-COHN, U. : Oral Contraception and Serum Protein Bound Iodine  
Lancet 6, 317 (1965)
49. DOWLING, J. Th. , The Effect of Estrogens upon the peripheral Metabolism of Thyroxine  
N. FREINKEL, and J. Clin. Invest. 39, 1119 (1960)  
S. H. INGBAR:
50. FLORSHEIM, W. H. , Effects of Oral Ovulation Inhibitors on and M. A. FAIRCLOTH: Serum Protein Bound Iodine and Thyroxine Binding Proteins  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 117, 56(1964)
51. HOLLANDER, Ch. S. , Effect of an Ovulatory Suppressant on the Serum Protein Bound Iodine and the Red-Cell Uptake of Radioactive Tri-Iodothyronine  
A. M. GARCIA, and New Engl. J. Med. 269, 501 (1963)  
S. H. STURGIS, and  
H. A. SELENKOW:
52. WALSER, H. C. , Effects of prolonged Administration of Progestins on the Endometrium and the Function of the Pituitary, Thyroid and Adrenal Glands  
R. R. MARGULIS, and Int. J. Fertil. 9, 189 (1964)  
and J. E. LADD:
53. GONTERMANN, D. , Zur Wirkung eines Ovulationshemmers auf Plasma-Steroide  
und G. W. OERTEL: Klin. Wschr. 44, 276 (1966)
54. UPMARK, E. A. : Thromboembolism and Oral Contraceptives post or propter?  
Acta med. scand. 179, 463 (1966)
55. HALLER, J. : Thrombose und Hormonbehandlung  
Dt. Med. Wschr. 90, 2124 (1965)
56. THOMSON, J. M. , Oral contraceptive hormones and blood coagulability  
and L. POLLER: Brit. Med. J. 31, 5456 (1965)

57. WATSON, W. C. , and D. MURRAY: Lactase Deficiency and Jejunal Atrophie Associated with Administration of Conovid  
Lancet 65 (1966/I)
58. THULIN, K. E. , and J. NERMARK: Seven cases of jaundice in women taking an oral contraceptive, Anovlar  
Brit. med. J. 584 (1966)
59. SWYER, G. I. M. , and V. LITTLE: Absence of hepatic impairment in long-term oral-contraceptive users  
Brit. Med. J. 5447 (1965)
60. DOHRMANN, R. E. und G. GIFFELS: Das Verhalten der Glutamat-Pyruvat-Transaminase, Aldolase und des Eiweißspektrums im Serum unter der Einwirkung eines Ovulationshemmers  
Med. Klinik 60, 46 (1965)
61. BOTTERMANN, P. , K. KOPETZ, P. DIETERLE, P. C. SCRIBA, W. HOCHHEUSER, K. SCHLEYPEN, K. HORN, M. DAMBACHER und K. SCHWARZ: Klinische Untersuchungen über die Glukosetoleranz sowie Bestimmungen von Insulin, Trijodthyronin-Bindung und der 11-Hydroxycorticosteroide im Serum  
12. Sympos. Dt. Ges. Endokrinol. , Wiesbaden, Springer (1966) im Druck
62. TOBIASCH, V. und C. GEBHARDT: Über klinische Syndrome und Todesursachen bei Adipositas  
Die Med. Welt 2727 (1965)
63. GERNER, G. : Zur Klinik und Pathogenese der Fettsucht (neuere Arbeiten)  
Mat. Med. Nordmark 16, 341 (1964)
64. DAWEKE, H. , H. van LANDEGHEM, I. BACH, H. ZIMMERMANN und A. BREITBACH: Bestimmung der insulinähnlichen Aktivität und der physiologischen Insulin-Reserve bei schwerer Adipositas  
Klin. Wschr. 43, 185 (1965)

65. BOTTERMANN, P., K. SCHWARZ und K. KOPETZ: Über das Verhalten der insulinähnlichen Aktivität im Serum bei der Fettsucht Dt. med. Wschr. 90, 917 (1965)
66. BOTTERMANN, P., K. SCHWARZ, R. SCHULZE-SÖLDE und M. DAMBACHER: Untersuchungen über den Fettstoffwechsel bei der Fettsucht Diabetologia 1, 180 (1965)
67. KARAM, J. H., G. M. GRODSKY, F. Ch. PAVLATOS, and P. H. FORSHAM: Critical Factors in excessive Serum-Insulin Response to Glucose (Obesity in Maturity-onset Diabetes and Growth Hormone in Acromegaly Lancet 286 (1965)
68. BOTTERMANN, P., K. SCHWARZ, K. KOPETZ und M. DAMBACHER: Bestimmungen der mit Antikörpern hemmbaren und nicht hemmbaren Seruminsulinaktivität bei der Fettsucht und das Verhalten nach intravenösen Glucosegaben Klin. Wschr. 44, 473 (1966)
69. SCHTEINGART, D. E., R. I. GREGERMAN and J. W. CONN: A Comparison of the Characteristics of Increased Adrenocortical Function in Obesity and in Cushing's Syndrome Metabolism 12, 484 (1963)
70. KARL, H. J. und L. RAITH: Die Corticosteronsekretion beim Menschen I. Methode zur Bestimmung der Sekretionsrate. Werte von Normalpersonen. II. Beziehungen zu Körpergewicht und Körperoberfläche. Vergleich zur Cortisolsekretion. Klin. Wschr. 43, 863 und 867 (1965)
71. BENOIT, F. L. and F. Y. DURRANCE: Radiothyroxine Turnover in Obesity Am. J. Med. Sci. 249, 647 (1965)

72. FLEISCH, A. und W. RIES: Der Grundumsatz bei Fettleibigkeit  
Schweiz. med. Wschr. 95, 1092 (1965)
73. GOLDBERG, M. , and E.S. GORDON: Energy Metabolism in Human Obesity  
J. Amer. Med. Ass. 189, 616 (1964)
74. KAZMEIER, F. , F. H. FRANKEN, H. LINS und B. SACHSSE: Krisen bei Erkrankungen des Stoffwechsels und der inneren Sekretion  
F. Enke-Verlag, Stuttgart (1962)
75. GOTTSTEIN, U. : Der Hirnkreislauf bei Hyperthyreose und Myxödem  
Verh. Dt. Ges. Int. Med. 70, 921 (1964)
76. SCHWARZ, K. und P. C. SCRIBA: Endokrin bedingte Encephalopathien.  
Referat Verh. Dt. Ges. Inn. Med. 72 (1966) im Druck
77. VAGUE, J. , H. GASTAUT, J. L. CODACCIONI et A. ROGER: L'Electroencéphalographie des Maladies Thyroïdiennes  
Annales d'Endocrinologie 18, 996 (1957)
78. VAGUE, J. , H. GASTAUT, J. L. CODACCIONI, A. ROGER et J. MONTICELLI: L'Electroencephalogramme au Cours de l'Evolution des Hyperthyroïdoses  
Annales d'Endocrinologie 22, 203 (1961)
79. FAURE, J. : Etudes expérimentales de l'influence des facteurs hormonaux et métaboliques sur l'activité électrique du cerveau  
Revue neurologique 100, 255 (1959)
80. CONDON, J. V. , D. R. BECKA, and F. A. GIBBS: Electroencephalographic Abnormalities in Hyperthyroidism  
J. clin. endocr. 14, 1511 (1954)

81. CONDON, J. V. ,      Electroencephalographie Abnormalities  
D.R. BECKA, and      in endocrine Disease  
F.A. GIBBS:            Engl. J. Med. 14, 638 (1954)
  
82. WILSON, W. P., and    Thyroid Hormone and Brain Function  
J.E. JOHNSON:          I. The EEG in Hyperthyroidism with  
                             observations on the Effect of age, sex,  
                             and reserpine in the productive of Abnor-  
                             malities  
                             EEG clin. Neurophysiol. 16, 321 (1964)
  
83. WILSON, W. P. ,      Thyroid Hormone and Brain Function  
J.E. JOHNSON, and    II. Changes in photically elicited EEG  
F.W. FEIST:            Responses following the Administration  
                             of Triiodothyronine to normal subjects  
                             EEG clin. Neurophysiol. 16, 329 (1964)
  
84. ROHMER, F. ,          L' EEG dans les Syndromes endocriniens  
A. WACKENHEIM        Hypophysaires, Thyroïdiens, Surrénaux  
et D. KURTZ:            et dans la Tétanie de l'Adulte  
                             Revue Neurologique 100 N<sup>o</sup> 4 (1959)
  
85. BARKER, S. B. ,        The Clinical Determination of Protein  
M.J. HUMPHREY,        Bound Iodine  
and M. H. SOLEY:      J. Clin. Invest. 30, 55 (1951)
  
86. EINHORN, J. ,          Thyroid antibodies after <sup>131</sup>I treatment  
A. FAGRAEUS, and      for hyperthyroidism  
J. JOHNSON:            J. clin. Endocr. 25, 1218 (1965)
  
87. FRERICHS, H. ,        Änderungen der Glukoseassimilisation  
S. GROTE,              im Verlauf des Menstruationszyklus und  
E. SEVERIDT und        während der Behandlung mit einem  
W. CREUTZFELDT:      Ovulationshemmer  
                             12. Sympos. Dt. Ges. Endokrinol.  
                             Wiesbaden
  
88. JOWSEY, J. :            Quantitative microradiography. A new  
                             approach in the evaluation of metabolic  
                             bone disease  
                             Am. J. Med. 40, 485 (1966)

## LEBENS LAUF

Am 29. Juli 1941 wurde ich als Sohn des Dipl. ing. Theodor Horn und der Kinderärztin Dr. med. Erna-Dorothea Horn, geborene Eickhoff, in Berlin geboren.

Die Volksschule besuchte ich von 1947 - 1950 in Hannover. In Erlangen trat ich 1951 in das humanistische Gymnasium ein und legte dort im Juli 1960 die Reifeprüfung ab.

Zur Ableistung des Wehrdienstes wurde ich im Oktober 1960 zur Bundeswehr eingezogen und als Fahnenjunker der Reserve im Dezember 1961 entlassen.

Das Medizinstudium begann ich 1961 in Erlangen, wo ich 1963 das Vorphysikum und 1964 das Physikum bestand. Seit 1964 bin ich an der Universität München immatrikuliert.

Im Juni 1967 legte ich in München das Medizinische Staatsexamen ab.





